

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POSGRADO

**“EFECTO ANTIMICROBIANO DE *Psidium guajava* L.
CONTRA *Salmonella typhymurium* EN *Cavia porcellus*
L.”**

TESIS

**Para optar el Grado Académico de Magister en
Microbiología**

AUTOR

Carlos Alberto Pineda Castillo

Lima – Perú

2013

ASESOR:

MG. MIRTHA ROQUE ALCARRAZ

DEDICATORIA

A Carlos Leonardo Pineda
Barbarán, padre amoroso,
abnegado, humilde y generoso.

AGRADECIMIENTOS

- A la Dra. Mirtha Roque Alcarraz, por su asesoramiento en el presente trabajo de investigación.
- Al Dr. César Fuertes y Dra. Bertha Jurado por su colaboración en la preparación de la muestra y marcha fitoquímica de la misma, respectivamente.
- A la Dra. Magdalena Pavlich Herrera por su conmovedora generosidad y encantadora motivación.
- A la Blga. Margarita Zuñiga Sacca, Jefa del Laboratorio de Referencia de la DISA-Huánuco, por su intercesión en el control de calidad de los resultados del estudio farmacológico.
- A la M.V Soledad Camiloaga Espinoza, por su colaboración en el estudio farmacológico.
- A mis maestros de la Unidad de Postgrado de Farmacia y Bioquímica, especialidad Microbiología, por su noble labor en la formación académica de los maestristas.

INDICE GENERAL

CONTENIDO	PAGINA
INDICE DE CUADROS	
INDICE DE FIGURAS	
INDICE DE FOTOS	
RESUMEN	
ABSTRACT	
I. INTRODUCCION	01
II. REVISION BIBLIOGRAFICA	03
1. EL GUAYABO	03
1.1 GENERALIDADES	03
1.2 CLASIFICACIÓN	03
1.3 DESCRIPCION BOTANICA	04
1.4 IMPORTANCIA NUTRICIONAL	05
1.5 PERFIL TOXICOLÓGICO	10
1.6 PERFIL ANTIMUTAGÉNICO	10
1.7 IMPORTANCIA CLÍNICA	11
1.8 OTRAS PLANTAS CON PROPIEDADES ANTIDIARREICAS	18
2. PROBLEMAS GASTROINTESTINALES	19
2.1 FISIOPATOLOGÍA DE LA DIARREA	19
2.2 SALMONELOSIS	20
2.3 TRATAMIENTO ALTERNATIVO: MECANISMO DE ACCIÓN	23
III. MATERIALES Y METODOS	25
1. LUGAR DE EJECUCIÓN	25

2. MATERIAL BIOLÓGICO	25
3. MÉTODOS	27
3.1 ESTUDIO FITOQUÍMICO	27
3.2 ESTUDIO TOXICOLÓGICO	31
3.3 ESTUDIO MICROBIOLÓGICO	31
3.4 ESTUDIO FARMACOLÓGICO	37
4. DISEÑO EXPERIMENTAL	38
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	39
IV. RESULTADOS	40
1. RENDIMIENTO	40
2. MARCHA FITOQUÍMICA	40
3. ESTUDIO TOXICOLÓGICO	40
4. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	40
5. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA	44
6. ESTUDIO FARMACOLÓGICO	45
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	47
V. DISCUSIÓN	48
1. RENDIMIENTO	49
2. MARCHA FITOQUÍMICA	49
3. ESTUDIO TOXICOLÓGICO	50
4. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	50
5. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA	51
6. ESTUDIO FARMACOLÓGICO	52
VI. CONCLUSIONES	53
VII. RECOMENDACIONES	54
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
IX. ANEXOS	70

INDICE DE CUADROS

Nº	TITULO	PÁGINA
01	Componentes químicos por 100 gr de porción comestible de guayaba.	7
02	Análisis foliar de dos nuevas variedades de guayaba creadas en la Universidad Nacional de Sao Paulo .	8
03	Relación de equipos y materiales empleados en el presente estudio .	26
04	Marcha fitoquímica preliminar de los extractos de hojas de guayabo	41
05	Actividad antimicrobiana de los extractos de hojas de guayabo contra algunas cepas referenciales.	42
06	Concentración mínima inhibitoria de los extractos de hojas de guayabo contra algunas cepas referenciales.	44
07	Proceso de recuperación de los cuyes con salmonelosis durante el estudio farmacológico con diferentes concentraciones y extractos de hojas de guayabo.	45
08	Recuento bacteriano en cuyes con salmonelosis, durante el estudio farmacológico con diferentes concentraciones y extractos de hojas de guayabo .	46

INDICE DE FIGURAS

Nº	TITULO	PÁGINA
01	Flujograma que señala el proceso para la preparación de los extractos, a partir de la especie botánica recolectada.	29
02	Flujograma que señala los procedimientos para la obtención de la DL ₅₀ .	32
03	Método de difusión en fosas de agar para demostrar actividad antimicrobiana.	35
04	Determinación de la CMI, mediante diluciones seriadas dobles y método de difusión en fosas en agar .	36

INDICE DE FOTOS

Nº	TITULO	PÁGINA
01	Actividad antimicrobiana de diferentes tipos de extracto de hojas de guayabo contra <i>Salmonella typhimurium</i> .	43
02	Actividad antimicrobiana de diferentes tipos de extracto de hojas de guayabo contra <i>Staphylococcus aureus</i> .	43

RESUMEN

La explotación de cobayos es una actividad económica muy difundida en la zona andina del Perú, la cual tiene que sortear una serie de dificultades, siendo la mas importante de todas la salmonelosis. En consecuencia, para remediar dicho problema, sin incrementar los costes de producción, se opto por emplear la medicina alternativa con recursos propios de la zona. Es así, que se probó la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de hojas de guayaba (*Psidium guajava* L.) contra *Salmonella entérica* ser. Typhimurium en cobayos, tanto *in vitro*, como *in vivo*. El extracto por reflujo probó ser más activo (19 mm) que el extracto por maceración (16,7 mm) mediante el método de difusión en fosas en agar. La concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto por reflujo fue 1,56 mg mL⁻¹, mientras que la del extracto por maceración fue 2,60 mg mL⁻¹. Por otro lado, el tratamiento alternativo de la salmonelosis en cobayos, fue más efectivo con la concentración de 200 mg mL⁻¹ de extracto por reflujo, el cual produjo la curación clínica del total de animales del grupo experimental, al tercer día de tratamiento, sin haber mostrado efectos tóxicos aparentes.

Palabras clave: Salmonelosis en cobayos; medicina etnoveterinaria; extracto de hojas de guayabo.

ABSTRACT

Guinea-pigs's exploitation is an economic activity very diffuse in the Perú's Andean zone, her as he has to sort a difficulties series, being her but important of everyone her salmonellosis. In consequence the alternative medicine with own resources of the zone chooses using itself, to remedy said problem, without incrementing production costs. He is thus, that leaves ethanolic of guava tried the juice's antimicrobial activity himself (*Psidium guajava* L.) Against *enteric Salmonella* being. Typhimurium in Guinea-pigs, so much *in vitro*, as *alive in*. The reflux extract was most active (19 mm) than macerate extract (16,7 mm) through the agar well diffusion method. Minimum inhibitory concentration (MIC) of the reflux extract was 1,56 mg mL⁻¹, whereas macerate extract was 2,60 mg mL⁻¹. On the other hand, the alternative treatment of the salmonellosis in guinea pigs was most effective at a dose of 200 mg mL⁻¹ of reflux extract, which yielded total recovery in animals of the experimental group, at the third day of treatment, without showing toxic effects.

Key words: Salmonellosis in guinea pigs; ethnoveterinary medicine; extract from guava leaves.

I. INTRODUCCIÓN

La salmonelosis es una enfermedad infecciosa de las vías entéricas que provoca cuadro diarreico profuso, con la consiguiente deshidratación y muerte de los animales que la padecen, especialmente cuando estos son jóvenes y su capacidad inmunológica se encuentra vulnerable. Esta enfermedad es una de las principales causas de pérdida económica en toda explotación pecuaria, y la de los cuyes (cuyes) no es la excepción. Una vez que el agente de la salmonelosis (*Salmonella typhimurium*) se instala en la granja, su perjuicio va en aumento, eliminando gradualmente a todos los miembros del plantel.

La explotación de cuyes es una actividad económica tradicional, muy difundida en la sierra del Perú, la cual es conducida, mayormente de manera artesanal, bajo un sistema de crianza no tecnificado que prevalece a pesar de la situación de pobreza y extrema pobreza en que viven muchas familias del ande peruano.

Los animales adultos, o los que han logrado sobrevivir a la salmonelosis, se convierten automáticamente en portadores y diseminadores de la *Salmonella typhimurium*, dentro y fuera de la instalación, constituyendo un riesgo para la salud pública.

La medicina alternativa ha cobrado vigencia y resulta oportuna en medio de una ganadería incipiente, opacada por la inoperancia del Gobierno Regional que no invierte en tecnología, capacitación y aseguramiento de la producción. En este sentido, el guayabo (*Psidium guajava* L) es un digno representante de una cultura que se trata de revalorar científicamente y motivo de la presente investigación, que tiene como objetivo demostrar, tanto *in vitro* como *in vivo*, la actividad antimicrobiana del extracto de hojas de guayabo contra *Salmonella typhimurium* en cuyes, para lo cual se determinará la concentración capaz de inhibir el crecimiento de dicha bacteria, restablecer la salud de los animales con salmonelosis, y recuperar este bien capital, base de la economía de muchas familias de la sierra del Perú.

Siendo la salmonelosis una de las principales causas de las pérdidas económicas en la producción de cuyes, y considerando que la gran mayoría de esta se encuentra a nivel incipiente, incapaz de competir con los grandes productores, se hace necesario conseguir métodos alternativos que controlen dicha enfermedad, de tal forma que permita abaratar los costes de producción, aprovechando los recursos naturales de la región. En este sentido, el presente estudio se propuso determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto de hojas de guayabo y determinar la dosis efectiva (DE), capaz de controlar la salmonelosis en cuyes, con las cuales debiéramos aceptar la hipótesis que otorga propiedades antimicrobianas a las hojas de guayabo, en el control de la salmonelosis.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. EL GUAYABO

1.1 GENERALIDADES

Los historiadores se contradicen en sus escritos respecto al probable origen de la planta; sin embargo, la ubican en el área comprendida entre México y Perú (1).

En tumbas precolombinas de la cultura Chilca, Perú (5700 – 3000 a.C.) se encontraron semillas de guayaba conjuntamente con la de otras plantas cultivadas (2).

El guayabo se ha extendido ampliamente en todas las áreas tropicales y subtropicales del mundo porque prospera en variedad de suelos, se propaga fácilmente, y dan frutos relativamente rápido (3). El tiempo que transcurre desde la emergencia de la flor hasta la maduración del fruto es de 5 a 6 meses, lo cual depende del clima y del material genético (4).

1.2 CLASIFICACIÓN

La clasificación que se señala a continuación pertenece al Integrated Taxonomic Information System (5) y la Gerplasm Resources Information Network (6)

Reino	: Vegetal
Sub Reino	: Tracheobionta
División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Sub Clase	: Rosidae
Orden	: Myrtales
Familia	: Myrtaceae

Genero : *Psidium*

Especie : *Psidium guajava* L.

Nombre común: guava, lemon guava (inglés); koejawel (africano); goyavier (francés); guave, guavenbaum, guayave (alemán); banjiro (japonés); goiaba, goiabeiro (portugués); guayaba, guayabo (español).

1.3 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

a. ARBOL

El guayabo es, generalmente, un árbol bajo o un arbusto arborescente de 3 a 10 metros de altura que, bajo ciertos cuidados y condiciones climáticas, puede alcanzar hasta 10 metros (7, 8, 3). Tienen un tallo corto y torcido. Ramifica libremente cerca del suelo y puede llegar a ser muy denso (4, 8).

En la corteza de sus troncos y de sus ramas, existen felógenos de diversos colores que forman capas de corcho que se desprenden en escamas o pedazos pequeños. Las ramas jóvenes portan, al inicio, alas angostas a los cuatro lados, que luego se convierten en tetrágonas de color café negruzco; las ramas viejas y pequeñas son de color café rojizo claro, opacas y lisas, con lenticelas diseminadas (9, 7).

b. HOJAS

Las hojas del guayabo son de colores verde claro u oscuros; ovales, oblongos u oblongo-elípticos; entrecruzadas o dísticas hacia el ápice de las ramas. Miden de 3 a 6 cm de ancho y de 3 a 16 cm de largo, cara superior lisa y más oscura, la inferior pubescente y con nervaduras prominentes (7, 8).

c. FLORES

Las flores son hermafroditas y pediculadas, con un diámetro aproximado de 3,8 cm. Nacen solitarias o en grupos de dos a tres, en

las axilas de las hojas que se encuentran en los crecimientos del año o de la estación en curso, rara vez son terminales. Poseen de cuatro a cinco pétalos aovados, de color blanco, con una longitud de 1,5 a 2 cm (7).

d. FRUTO

El fruto es una baya esférica, globulosa, elipsoidal o piriforme; es averrugado o liso, densamente punteado, brillante, con 4 a 12 cm de largo y 4 a 7 cm de ancho; su peso va de 30 a 225 g (10, 7, 8).

El epicarpio presenta un color amarillo verdoso y amarillo en su plena madurez; en el mesocarpio se hallan células duras, esclerósicas, solas o en grupos que le dan la consistencia arenosa característica; en el endocarpio se encuentra una masa de material pulposo donde se encuentran depositadas las semillas (10, 9, 7, 8).

e. SEMILLAS

Las semillas son abundantes, pétreas, triangulares, reniformes, comprimidas, de color blanco, amarillo claro o café amarillento, de 3 a 5 mm de longitud (7, 8).

1.4 IMPORTANCIA NUTRICIONAL

a. DEL FRUTO

Cambios físicos y químicos ocurren durante el desarrollo y maduración del fruto del guayabo. El peso máximo y el incremento de glucosa ocurre entre la 10ª y 12ª semana; la reducción de la dureza y cambios en el contenido de pectina y ácido ascórbico ocurren, mayormente, entre la 12ª y 14ª semana; y los niveles de fructosa son los mas altos de entre los tres azúcares identificados (fructosa, glucosa y sacarosa) durante la maduración (11). La acumulación de azúcares esta asociada con el desarrollo de una óptima calidad comestible y los mismos pueden ser incorporados al fruto desde la corriente de

fotosintetizados, más que a la degradación de las reservas de almidón del fruto (12).

Generalmente los ácidos disminuyen durante la maduración, ya que ellos son sustratos respiratorios o son convertidos en azúcares. De tal forma, que estos pueden ser considerados una fuente de energía y se esperaría que disminuyeran durante la actividad metabólica que se desarrolla durante la maduración (12).

Al respecto de sus constituyentes volátiles, son β -cariofileno y aromadendreno los que se encuentran en mayor proporción, aunque pudiera haber diferencias cuantitativas dependiendo del lugar de origen (13).

Se ha podido demostrar como algunos principios agroclimáticos resultan básicos en la producción de plantas medicinales, y que el rendimiento de los cultivos está influenciado por el manejo del cultivo (incluye tanto su rango de adaptación, las técnicas y métodos culturales, y los sistemas de producción agrícola) y del medio, fundamentalmente el clima donde el mismo se va a desarrollar (14). En este contexto, es de esperar que se presenten diferentes concentraciones de componentes químicos en el fruto (Cuadro1).

La dieta es el mayor suplidor de nutrientes que contienen propiedades antioxidantes, como la vitamina E, vitamina A, carotenoides, ácido ascórbico, flavonoides, etc., o elementos para la síntesis de enzimas antioxidantes (15). En este sentido, los frutos del guayabo se perfilan como uno de los de mayor capacidad antioxidante por el contenido total de fenoles, proantocianidinas, flavonoides y vitamina C; siendo los dos primeros quienes mostraron una fuerte correlación a tal actividad (16).

Cuadro 1. Componentes químicos por 100 g de porción comestible de guayaba

Composición	Miami, Florida (125)	México (1)	Nigeria (126)	Malasia (47)
Calorías	36-50	30	NR	NR
Humedad	76-86 g	77 g	82 g	NR
Fibra cruda	2,8-5,5 g	8,15 g	1,37 g	6,76 g
Proteínas	0,9-1,0 g	0,95 g	1,37 g	NR
Grasas	0,1-0,5 g	0,45 g	0,57 g	NR
Cenizas	0,43-0,7 g	0,95 g	0,73 g	NR
Carbohidratos	9,5-10 g	8,85 g	14,23 g	NR
Calcio	9,1-17 mg	NR	NR	NR
Fósforo	17,8-30 mg	NR	NR	NR
Hierro	0,30-0,70 mg	NR	NR	NR
Caroteno	200-400 UI	200 UI	NR	59,5 µg
Retinol	NR	NR	NR	9,9 µg
Tiamina	0,046 mg	NR	NR	0,1 mg
Riboflavina	0,03-0,04 mg	NR	NR	0,05 mg
Niacina	0,6-1,068 mg	NR	NR	1,08 mg
Vitamina B3	40 UI	40 UI	NR	NR
Viatmina G4	35 UI	35 UI	NR	NR
Vitamina C	NR	300 UI	260 UI	151,4 mg
Taninos	NR	0,95 g	NR	NR

NR= No reportado

b. DE LAS HOJAS

La composición nutritiva de las hojas varía de acuerdo a su grado de madurez, edad del árbol, variedad y disponibilidad de nutrientes del suelo. El contenido de nutrientes en las hojas mostró una marcada correlación con la producción de frutos (Cuadro 2).

Cuadro 2. Análisis foliar de dos nuevas variedades de guayaba creadas en la Universidad Nacional de Sao Paulo (17)

Composición	Variedad	
	Rica	Paluma
Nitrógeno	22-26 g/K	20-23 g/K
Fósforo	1,5-1,9 g/K	1,4-1,8 g/K
Potasio	17-20 g/K	14-17 g/K
Calcio	11-15 g/K	7-11 g/K
Magnesio	2,5-3,5 g/K	3,4-4,0 g/K
Azufre	3,0-3,5 g/K	2,5-3,5 g/K
Boro	20-25 mg/K	20-25 mg/K
Cobre	10-40 mg/K	20-40 mg/K
Hierro	50-150 mg/K	60-90 mg/K
Manganeso	180-250 mg/K	40-80 mg/K
Zinc	25-35 mg/K	25-35 mg/K

En el complejo ambiental donde crecen las plantas, esencialmente el clima ejerce gran influencia en lo que respecta a los principios activos. La luz, temperatura y precipitaciones, fundamentalmente, tienen un efecto marcado sobre su presencia en las plantas; también la velocidad del viento, factor poco estudiado experimentalmente, es determinante en muchos casos, se conoce que por su acción se incrementa la evaporación de aceite esenciales y que, sin embargo, en el caso de los alcaloides tropánicos, el aumento de la transpiración en las plantas hace que sea mayor el contenido de líquido que asciende por las raíces, por lo que es muy probable, aunque no se ha comprobado, que por esta vía se incrementa el contenido en las hojas de estos alcaloides (para aquellas especies que la producen) (14).

Psidium guajava tiene mayor proporción de hidrocarburos sesquiterpénicos (18). El análisis de las esencias por hidrodestilación de material vegetal seco, recolectado en cinco zonas distintas de la Provincia de Corrientes, Argentina demostró que el β -cariofileno aparece en forma constante en todas las esencias analizadas, a diferencia del α -humuleno que muestra variaciones cuantitativas (19). Por el contrario, en Nigeria, los principales componentes hallados en *P. guajava* fueron limoneno y β -cariofileno (20), y en Brasil, los aceites esenciales predominantes fueron α -pineno, 1,8-cineol y β -bisaboleno (21).

Entre otros constituyentes aislados de las hojas de guayabo están los triterpenoides y los flavonoides. De los primeros, fueron aislados en Pakistán el ácido guavanoico y el ácido guavacoumarico (22); y de los segundos, fueron identificados en Japón la morina, morina-3-o-lixosido, morina-3-o-arabinosido, quercetina, y quercetina-3-o-arabinosido (23), mientras que en México fueron aislados la miricetina, quercetina, luteolina, kaempferol y apigenina (24).

c. DE LAS SEMILLAS

El análisis cromatográfico de las grasas de las semillas de guayaba reveló 9,4% de lípidos neutros, principalmente triglicéridos; de esta cantidad, 79,1% correspondieron, al ácido linoleico, 7,8% al ácido oleico, y 3,4% al ácido esteárico. Cabe señalar que no hubo diferencia composicional a diferentes estados de desarrollo de las semillas (12).

1.5 PERFIL TOXICOLÓGICO

El estudio de toxicidad del extracto etanólico de hojas de guayaba sobre *Aspergillus nidulans* UH-223 no resultó tóxico hasta la concentración de 0,856 mg/mL, pues el índice de toxicidad siempre estuvo en el rango de NO TOXICO (menor al 15%), según el criterio de Kappas. Así mismo, ha dicha concentración no se halló cambios en el índice de segregación mitótica (ISMI), ya que este siempre se mantuvo dentro del rango menor (3%) (25). De modo similar se llevó a cabo un estudio con extracto acuoso y hexánico de hojas de guayabo. El ensayo de genotoxicidad *in vitro* con *Aspergillus nidulans* D-30, e *in vivo* por inducción de micro núcleos en medula ósea de ratón fueron negativos para el extracto acuoso en las concentraciones estudiadas (0,0012 – 1,273 mg/mL). En cambio, el extracto hexánico, si bien es cierto fue seguro en el ensayo *in vivo*, no lo fue para el ensayo *in vitro* a una concentración de 0,53 mg/ml (26).

1.6 PERFIL ANTIMUTAGÉNICO

El extracto acuoso de hojas de guayabo fue efectivo para inactivar a mutágenos de acción directa, en cepas de *Salmonella typhimurium*, ello sugiere que junto al ácido ascórbico y ácido cítrico, habrían otros factores antimutagénicos en el extracto que debieran identificarse (27). Un año después, se aisló (+)-gallocatequina, un componente bio-antimutagénico obtenido del extracto etanólico de hojas de guayabo, el cual redujo la actividad mutagénica relativa contra mutación inducida por rayos UV en *Escherichia coli* (28).

1.7 IMPORTANCIA CLÍNICA

a. GENERALIDADES

En Mozambique las hojas del guayabo ofrecen un gran recurso para tratar problemas respiratorios, resfriados, tos y pecho oprimido, en preparaciones para beber o inhalar, ya sean solas o acompañadas de otras hojas (*Persea americana*, *Anacardium occidentale*). Para resolver problemas inflamatorios externos, las hojas son aplicadas calientes, y para corregir dolores de barriga y diarrea, se emplea la decocción de las hojas y la raíz, o simplemente se mascan las hojas (29).

El guayabo goza de gran popularidad en la medicina tradicional en América, donde el empleo es mas amplio e involucra a toda la planta, aunque las partes mas utilizadas son las hojas y el fruto (29).

Un estudio etnobotánico realizado en Guatemala señala que la guayaba está indicado solo para controlar la diarrea e indigestión (30).

La medicina popular mexicana recomienda, en la actualidad, el uso de la decocción de hojas de guayabo por vía oral, tres veces al día, como un remedio efectivo para tratar la diarrea aguda, cólico, flatulencia y dolor gástrico (31).

En Brasil, la guayaba es considerada un astringente y diurético, y es usado para las mismas condiciones como en Perú. La decocción es recomendada, en gárgaras, para aliviar el dolor de garganta, laringitis e hinchazón de la boca, o usada externamente para úlceras de la piel, y descargas e irritación vaginal (3).

La farmacéutica etnobotánica de Perú refiere que el cocimiento de 30 g/L de corteza o fruto verde de guayaba se usa como astringente-antidiarreico; por el contrario, la infusión de 15 g/L de las hojas sirve como hemostático-enpéptico. En ambos casos, la administración es oral a razón de un vaso, tres a cuatro veces al día (8).

En el sistema de medicina tradicional peruano, la guayaba es empleada actualmente contra la diarrea, gastroenteritis, gusanos intestinales, desordenes gástricos, vomito, tos, descargas vaginales, hemorragias y dolor menstrual, y edema (3).

b. ACTIVIDAD ANTIDIARREICA

Del África se sucedieron una serie de investigaciones que han tenido por finalidad revalorar la medicina popular de sus tribus, dando inicio a trabajos de revisión, como los llevados a cabo en Senegal, en el cual los datos etnobotánicos y farmacológicos de 43 plantas medicinales citan la actividad antidiarreica de la guayaba a finales de los años cincuenta (32). Del mismo modo, un estudio efectuado en Ruanda, demostró que dentro de las 20 plantas medicinales usadas para tratar enfermedades diarreicas, la única perteneciente a la familia Myrtaceae fue la guayaba, con una efectividad del 60% (33).

Al respecto de América Latina, la etnobotánica medicinal Maya consideró entre 106 remedios, al machacado de la corteza del guayabo para corregir la diarrea y la indigestión (30). También en Guatemala, los bioensayos de 32 plantas ubicaron a la guayaba entre las seis mejores por su actividad espasmolítica (34).

En México, un inventario de la etnobotánica medicinal Zapoteca reportó 176 plantas para el tratamiento de desordenes gastrointestinales y afecciones hepáticas, de las cuales la guayaba ocupa el primer lugar por el número de respuestas positivas entorno a las condiciones señaladas (35). Por otro lado, la población de Zapotitlán también considera el uso de hojas y fruto del guayabo en el tratamiento de las diarreas (36).

Las anomalías en el transporte intestinal de agua y electrolitos juega un rol importante en la génesis y mantenimiento de la diarrea, a pesar de que los desordenes en la motilidad intestinal se constituya en parte básica de su fisiopatología. En consecuencia, la terapéutica más

provechosa deberá ser la que conduzca a normalizar el transporte de agua y electrolitos al otro lado de las células de la mucosa (37). Bajo este principio, se hicieron muchos ensayos con el guayabo, principalmente en aquellos lugares en donde se cultiva la planta. Así por ejemplo, en Malasia se ensayaron diversos extractos de las hojas del guayabo, llegándose a la conclusión de que el extracto acuoso de hojas secas presentaba 1,6 veces mayor actividad antisecretoria que el de las hojas frescas, y por consiguiente mayor actividad antipropulsiva del contenido intestinal (38).

La actividad antidiarreica del extracto etanólico de hojas de guayabo fue comprobada en Ruanda, con un modelo experimental de diarrea en ratones, inducidos con aceite castor (33). Esta misma experiencia fue llevada a cabo en Nigeria, con extracto metanólico, demostrándose una pronunciada actividad antidiarreica comparada con el control (39).

En Zulu, Sudáfrica, se demostró que el extracto acuoso de hojas de guayabo redujo tanto la frecuencia de defecación, como la propulsión del contenido intestinal; además fue capaz de inhibir la actividad secretora de la prostaglandina PGE_2 (40).

En Cuba, los trabajos orientados a validar el uso del guayabo, condujeron a estimar la dosis capaz de reducir el tránsito intestinal en un modelo farmacológico preclínico en ratones, siendo la dosis calculada 430,05 mg/K. Considerando que se experimentó con el extracto crudo es probable que dicha actividad sea potenciada empleando los principios activos de la planta (41). Otro estudio preclínico con una suspensión oral, entre cuyos componentes se hallaba polvo de hojas de guayabo, fue administrada a ratas, en dosis de 3, 6, y 9 mg/K de peso, los cuales disminuyeron el cuadro diarreico, no hallándose diferencias estadísticamente significativas entre las dosis (42).

Un estudio llevado a cabo en Brasil, demostró que la infusión de hojas de guayabo incrementó la absorción de agua en el colon, mas no en las otras porciones proximales del intestino, en un modelo experimental en ratas; así mismo se demostró la reducción de la propulsión gastrointestinal (43).

Un estudio realizado en 50 pacientes con enfermedad diarreica aguda del Instituto Mexicano de Seguridad Social, a quienes se les sometió a un tratamiento a base de concentrado de flavonoides estandarizado, provenientes de las hojas de guayabo, redujo el dolor abdominal, aunque no se apreciaron cambios significativos con respecto a la frecuencia y consistencia de las heces (31).

La actividad antidiarreica del guayabo no solo se encuentra en las hojas, otras partes de la planta también ofrecen similares propiedades farmacológicas. Así, la fracción metanólica del extracto de frutos verdes de guayabo mostró actividad anti diarreica, al disminuir la motilidad gástrica en un modelo experimental animal, e inhibió la liberación de acetilcolina del íleon aislado de cobayo (44).

c. **ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

Los radicales libres son generados continuamente en el organismo debido al metabolismo y enfermedades; para protegerse de ellos, el organismo cuenta con defensas endógenas (catalasa, superoxido dismutasa, glutatión oxidasa/reductasa) y exógenos (vitaminas C y E, beta caroteno, ácido úrico), pero estos sistemas de defensa no son suficientes en situaciones críticas (estrés oxidativo, contaminación, exposición UV, etc.) donde la producción de radicales libres incrementan significativamente (45).

La fibra y los microconstituyentes antioxidantes de los alimentos vegetales, juegan un rol importante en la prevención de enfermedades crónicas y degenerativas. Ello condujo a los investigadores de la Universidad Central de Venezuela ha demostrar el valor nutritivo de la

guayaba. La cantidad de fibra total de la cáscara y la pulpa de la guayaba mostró un rango de 48,00-49,00 g/100 g de materia seca, con el cual cumple el primer requisito para ser considerada como una fibra antioxidante. Además se demostró que la cáscara tuvo mayor cantidad de fenoles y polifenoles solubles extraíbles que la pulpa de guayaba, esto les proporciona una gran actividad neutralizadora de radicales, y por consiguiente el segundo requisito para una fibra antioxidante (46).

Un estudio fue llevado a cabo en Malasia, con el propósito de evaluar los efectos del consumo de guayaba sobre los niveles de antioxidantes y lípidos en jóvenes varones normales. El consumo diario de 400 g de guayaba durante cuatro semanas significó el aumento de HDL-colesterol, el cual esta asociado con la reducción de riesgos de ataque al corazón y enfermedades cardiovasculares; así mismo incrementó significativamente el nivel de antioxidantes total, el cual esta asociado con la disminución de riesgo de enfermedades mediadas por radicales libres tales como el cáncer (47).

Las hojas de guayabo contienen cantidades significativas de fenoles naturales que actúan como antioxidantes. Comparando dos extractos de hojas de guayabo se pudo demostrar que el extracto etanólico tuvo mayor actividad antioxidante que el extracto acuoso, debido a la mayor cantidad de componentes fenólicos que le permite mayor habilidad para neutralizar radicales (48). A propósito de ello, la determinación de componentes fenólicos del extracto de hojas de guayabo, indicó que el ácido ferulico es el responsable de la actividad antioxidante (49).

d. OTRAS ACTIVIDADES FARMACOLÓGICAS

El extracto de las hojas de guayabo tuvo acción (dependiente de la concentración) sobre las aurículas del cuy, interfiriendo con los mecanismos de contracción, por depresión de la fuerza miocárdica. Este resultado sugiere que las sustancias activas actúan como un

agonista colinérgico, o que este liberaría acetilcolina de las terminaciones parasimpáticas del miocardio (50).

La actividad antitusígena de las hojas de guayabo fue evaluado en ratas y cuyes. El resultado demostró que el extracto acuoso de las hojas, a dosis de 2 y 5 g/K vía oral, redujo la frecuencia de tos inducida por capsaicina aerosol en 35 y 54% respectivamente (51).

El extracto metanólico de hojas de guayabo inhibió el edema plantar inducido por carragenina en ratas, y el dolor inducido por ácido acético en ratones, al mismo tiempo mostró efecto antipirético. Con ello, también se demostró actividad depresiva del sistema nervioso central, al potenciar el tiempo de sueño del fenobarbital en ratones (39). De modo similar, se pudo demostrar que el aceite esencial de hojas de guayabo tuvo efecto analgésico frente a un modelo experimental con formalina y ácido acético en ratones (52). Por otro lado, la decocción de hojas de guayabo demostró considerable actividad inhibitoria frente a la liberación de calcio intracelular, inducida por cafeína, en un modelo experimental *in vitro* (53).

Entre diecisiete plantas medicinales de Tailandia, el aceite esencial de hojas de guayabo mostró la más alta actividad anti-proliferante frente a una línea celular de carcinoma epidérmico humano (54).

Es posible que los componentes bioactivos, tales como flavonoides y taninos contenidos en el extracto de hojas de guayabo, sean responsables de la inhibición de la adherencia de *Streptococcus mutans*. Los flavonoides son conocidos por tener actividad antiGTasa (glucosiltransferasa); esta enzima es responsable de la conversión de sacarosa a glucano insoluble adhesivo, el cual promueve la adherencia firme del *Streptococcus mutans* a la superficie de los dientes (55).

El fruto del guayabo tiene una lectina galactosa específica que previene la adhesión de *Escherichia coli* O157:H7 a los eritrocitos. La

prevención podría también deberse a la capacidad aglutinante de *E. coli* que posee la lectina de guayaba (56).

Con la finalidad de demostrar el sinergismo entre extractos de plantas y drogas antimicrobianas, se llevo a cabo un estudio en la Universidad Nacional Paulista de Mesquita Filho, Brasil, en el cual se pudo demostrar que el extracto metanólico de hojas de guayabo ocupó el tercer lugar, de un total de ocho plantas, por su sinergismo con nueve, de un total de once drogas, contra treinta y dos cepas de *Staphylococcus aureus* (57).

El uso de plantas medicinales en el tratamiento de las diarreas, condujo a un grupo de investigadores brasileiros ha experimentar, *in vitro*, la actividad inhibitoria de doce plantas frente a los rotavirus. La actividad del extracto acuoso de hojas de guayabo frente al rotavirus humano HCR3 y el rotavirus simio SA-11 fue 48% y 94% respectivamente (58).

En México se probó el efecto *in vitro* de la decocción de las hojas de guayabo contra *Giardia duodenalis*, la cual se ubicó en el tercer lugar, de un total de 14 plantas ensayadas, siendo superior, incluso, al control positivo (tinidazol) (59). Por otro lado, en el Congo, la corteza de los tallos del guayabo se ubico entre los primeros siete lugares, de un total de 35 plantas ensayadas contra *Entamoeba histolytica* (60).

Un estudio con nueve plantas del noreste de la India, demostró que el extracto etanólico de hojas de guayabo tuvo la mayor actividad anticestódica contra *Raillietina echinobothrida in vitro*, tan semejante al praziquantel (61). Similar eficacia obtuvo el extracto metanólico de hojas de guayaba, cuando fue desafiado con un modelo experimental en ratas infectadas con *Hymenolepis diminuta* (62).

e. LA GUAYABA Y LA MEDICINA ETNOVETERINARIA

En los países en vías de desarrollo se acostumbra, aun en nuestros tiempos, el ensayo de terapias tradicionales para mejorar la salud de los animales domésticos. Esta práctica sigue siendo desconocida por la comunidad veterinaria moderna, aunque otros procuran que se integre al sistema convencional, toda vez que la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha permitido que la etnomedicina humana se incluya en la prestación sanitaria a personas que, circunstancialmente, no son atendidas por el sistema convencional (63). Además, resultaría beneficioso, en la medida que dicha práctica sea capaz de reducir los índices de pobreza, tal como parece ocurrir en Pakistán y Sudáfrica, donde los ovinos y bovinos, respectivamente, juegan un rol importante en su economía (64, 65). Este panorama también es común en las comunidades nativas y campesinas del territorio peruano, donde el uso de plantas sirve para atender, principalmente, los problemas de índole productivo que causan las parasitosis (66, 67).

Al respecto del guayabo, su empleo en medicina veterinaria ha sido documentado; es así que, la decocción de sus hojas es administrada vía oral a perros para el tratamiento de diarreas inespecíficas (68). De manera similar, la decocción de hojas y frutos verdes fueron mezclados con cereales y suministrados a la dieta de caballos, como un complemento al tratamiento ortodoxo de la diarrea (69). Por otro lado, la tintura de hojas de guayabo contra la diarrea producida por *Candida albicans* y *Escherichia coli* en lechones, resultó 83% y 73% eficaz respectivamente, tras 96 horas de cumplido el tratamiento (70).

1.8 OTRAS PLANTAS CON PROPIEDADES ANTIDIARREICAS

El Instituto de Ciencias Médicas de Corea produjo una formulación herbal a la que denominó Soonkijangquebo™ (SKJQB), la cual probó ser segura, y poseer efecto espasmolítico y anti diarreico en conejo y ratón respectivamente (71). Estas mismas propiedades fueron demostradas en un

estudio llevado a cabo en Bangladesh, con extracto metanólico de la corteza de *Xylocarpus moluccensis* en ratones (72).

En el plano latinoamericano, la Universidad Autónoma Metropolitana de Xochimilco, demostró que el extracto metanólico de *Commelina coelestis* y *Alternanthera repens*, y extracto acuoso de *Alternanthera repens* presentaron efecto antidiarreico al inhibir el tránsito intestinal en ratas y ratones (73). De modo similar, en la Universidad Federal de Santa María, Brasil, se determinó la eficacia del extracto acuoso bruto de las hojas de *Psidium guajava*, *Stachytarpheta cayenensis*, *Polygonum punctatum*, *Eugenia uniflora* y *Aster squamatus*. Con excepción del *S. cayenensis*, todas las otras incrementaron la absorción de agua intestinal en ratas; por otro lado, todos los extractos, excepto el de *P. punctatum*, redujeron la propulsión gastrointestinal en ratones (43).

Un estudio, tratando de revalorar el uso de plantas medicinales nativas, fue llevado a cabo en la Universidad Nacional “Hermilio Valdizán” de Huánuco, Perú, donde se demostró que el extracto etanólico de hojas de *Tagetes elliptica* tuvo una eficacia del 80% en el control de la salmonelosis en cuyes, asociado a la reducción del número de unidades formadoras de colonia (UFC) y la diarrea (74).

2. PROBLEMAS GASTROINTESTINALES

2.1 FISIOPATOLOGÍA DE LA DIARREA

En el intestino existe un movimiento o flujo bidireccional de agua y de iones a través de la mucosa, por una parte hay una secreción de agua del plasma hacia la luz intestinal y por otra, una absorción de la luz intestinal hacia el plasma. Esto hace que se mantenga el equilibrio entre la absorción y la secreción intestinal, que son las dos funciones diferentes que presenta la mucosa intestinal. La absorción es normalmente mayor que la secreción, lo que da por resultado un balance positivo en la absorción de líquidos (75).

Cualquier cambio que ocurra en el flujo bidireccional de agua y electrolitos en el intestino delgado, bien porque se produzca una inhibición de los procesos de absorción o porque se estimule la secreción, o por ambos mecanismos a la vez, el volumen de agua y electrolitos que llega al colon excede su capacidad de absorción y se produce la diarrea (76)

La secreción se considera un mecanismo de defensa del organismo, que produce secreción de líquidos siempre que el epitelio intestinal se encuentre dañado, irritado o invadido por agentes químicos o elementos extraños. Existe una gran variedad de sustancias que pueden estimular al intestino a secretar líquidos. Ellas incluyen: toxinas bacterianas, neurotransmisores y sustancias paracrinas liberadas de leucocitos, linfocitos, macrófagos, mastocitos, células enteroendocrinas y enterocitos dañados. Comparativamente, algunas de ellas actúan de forma directa sobre el enterocito, pero la mayor parte opera por la vía del sistema nervioso entérico, de las células inflamatorias o inmunorreactivas (77).

Muchos de los mediadores de la inflamación son secretagogos intestinales. El daño de la célula epitelial estimula el metabolismo del ácido araquidónico por la vía de la cicloxigenasa y libera prostaglandina E_2 , la cual puede inducir la secreción intestinal. Los secretagogos pueden también ser liberados de células inflamatorias y de inmunocitos. Ellos incluyen histamina, serotonina, radicales libres de O_2 , factor de agregación plaquetaria (FAP) y kininas (77).

2.2 SALMONELOSIS

Salmonella es un bacilo Gram negativo que se comporta como patógeno intracelular facultativo. Tomando en cuenta sus características bioquímicas generales, se divide en dos especies: *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*. Esta última se subdivide en seis subespecies: *entérica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *indica* y *houtenae*. La subespecie entérica se subdivide en cuatro serovares: Enteritidis, Paratyphi, Typhimurium y Typhi. Considerando que solo *Salmonella entérica* subsp. *enterica* cuenta con tales serovares, esta permitido abreviar el nombre, es decir, colocar el nombre del

serovar en lugar del de la subespecie (por ejemplo, *Salmonella entérica* ser. Typhimurium) (78).

Actualmente se sabe que *Salmonella* cuenta con cinco islas de patogenicidad. Varios genes involucrados en la invasión, apoptosis de macrófagos y activación de cascadas de fosforilación dependientes de MAPquinas (Mitogen-activated protein) se encuentran en el centisoma 63, formando la isla de patogenicidad 1 (SPI-1). Los genes localizados en las islas SPI-2 y SPI-3 regulan la supervivencia y replicación bacterina en los compartimentos intracelulares de fagocitos y células epiteliales. La isla SPI-4 codifica un supuesto sistema de secreción tipo I y se cree que participa en la adaptación en ambientes intracelulares. Finalmente la isla SPI-5 codifica para factores involucrados en la secreción fluida y reacciones inflamatorias en la mucosa intestinal. Debido a una regulación coordinada y precisa de los genes de virulencia, *Salmonella* logra adaptarse a cambios ambientales que se le presentan durante el proceso infeccioso (79).

Al respecto del agente patógeno causante de salmonelosis en cuyes, se sabe que la *Salmonella typhimurium* es la más prevalente (95%), con respecto a otros serotipos (hoy serovares), según un trabajo realizado en Lima, Perú (80). Sin embargo, otros serotipos han sido señalados como responsables de salmonelosis en cuyes; así, en Nigeria se aisló *Salmonella ochiogu* (81) y en Turquía *Salmonella arizonae* (82).

La principal fuente de infección son los alimentos contaminados, pero podría asumirse que otras vías, como la conjuntiva y la intrauterina, estarían coadyuvando al mantenimiento de la infección (83, 84). Al respecto, un estudio llevado a cabo en condiciones naturales, demostró que *Salmonella weltevreden* también es capaz de producir invasión a través de la conjuntiva, pero a diferencia de la *S. typhimurium*, produce queratoconjuntivitis en cuyes (85)

Los signos clínicos en el cuy son a menudo inespecíficos: en la forma hiperaguda hay muerte; en la forma aguda se observa depresión, letargo,

disnea; la forma crónica se manifiesta con anorexia, pérdida de peso, pelaje áspero, conjuntivitis, reducción del número de crías, aborto y muerte esporádica; la diarrea es variable (86).

Las lesiones de salmonelosis aguda son similares a la de otros animales e involucran al hígado, bazo, tejido linfoide e intestino, el contenido de fluidos incrementa en el tracto gastrointestinal, los animales preñados pueden tener metritis purulenta. Las lesiones en casos subagudos a crónicos pueden mostrar al hígado y vísceras con focos necróticos amarillos e hiperemia, como también hiperplasia de las placas de Peyer y esplenomegalia. Microscópicamente se observa hepatitis granulomatosa multifocal, esplenitis y linfadenitis con áreas necróticas rodeadas por células mononucleares y neutrófilos (86).

El estudio hematológico y bioquímico en cuyes infectados intraperitonealmente con *Salmonella dublin* 493 reveló un significativo aumento en el conteo total de leucocitos, debido a la linfocitosis y neutrofilia, y una disminución en el conteo total de eritrocitos y concentración de hemoglobina. También hubo una significativa elevación del promedio del volumen corpuscular y una disminución del promedio de la concentración de hemoglobina corpuscular, lo cual indicó una anemia macrocítica hipocrómica. Por otro lado la infección causó un significativo incremento en la actividad de alanina aminotransferasa, creatinina y concentración de nitrógeno úrico y globulina, y una disminución en albumina y triyodotironina. No hubo efecto significativo sobre la proteína total sérica, tiroxina y actividad del aspartato aminotransferasa sérica (87).

La salmonelosis humana asociada a mascotas exóticas, constituye un serio problema de salud pública, afectando a más personas y animales que ninguna otra enfermedad. La salmonelosis asociado con la importación de animales exóticos ha sido reconocida como una enfermedad emergente en Canadá. Un elevado número de serotipos no comunes asociados con animales exóticos han sido observados en casos de salmonelosis en humanos (88).

Durante el 2004, el Laboratorio de Salud Publica del Departamento de Salud de Minnesota, notificó al Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) acerca del aislamiento de *Salmonella entérica* serotipo Typhimurium multidrogaresistente, aislado de hámster (*Cricetus cricetus*) enfermos de un distribuidor de mascotas de Minnesota. Este fue el primer documento de un brote de salmonelosis asociado a roedores empleados como mascotas. Los hallazgos demostraron que el manejo de hámster, ratones o ratas es un riesgo potencial para la salud, especialmente para los niños. Los profesionales de la salud debieran considerar a estos animales una potencial fuente de salmonelosis (89).

El control de calidad de nueve cepas de *Salmonella typhimurium*, originarias de cuyes de una explotación semitecnificada en Huánuco, Perú, determinó que el 55,5% (5/9) correspondieron a *Salmonella typhimurium*; 33,3% a *Salmonella kunduchi* (3/9) y 11,1% (1/9) a *Citrobacter freundii* (90).

2.3 TRATAMIENTO ALTERNATIVO: MECANISMO DE ACCIÓN

En la familia Myrtaceae hay una gran variedad de principios activos contra microorganismos, lo que incluye aceites esenciales, flavonoides (91) y taninos (92).

Los flavonoides son compuestos polifenólicos que están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, y forma parte de nuestra dieta alimenticia; pudiendo tener un rol fisiológico definitivo en el hombre y otros animales herbívoros. En consecuencia, las investigaciones puestas en marcha demostraron relación de los flavonoides con las enzimas del metabolismo del ácido araquidónico, lo cual promete contribuir a la regulación o deregulación de procesos fisiológicos relacionados a ciertas enfermedades (93).

Un estudio llevado a cabo en México, demostró que las hojas de guayabo son los órganos con mayor volumen y concentración de flavonoides, siendo quercetina el mas abundante de todos (1236 mg/K) (24). De tal modo que se perfila como el principal responsable de la actividad anti diarreica, al inhibir la liberación de acetilcolina y de prostaglandina (PGE₁), encargadas de

provocar las contracciones en el intestino y el incremento de la secreción intestinal respectivamente (94).

Posteriores investigaciones resolvieron que, tras la administración oral de infusión de hojas de guayabo, en el tratamiento de diarrea aguda, los glicósidos de quercetina serían hidrolizados a quercetina libre, alcanzando concentraciones apropiadas en el lumen intestinal (95), lo cual tendría efecto antagónico frente al calcio (96); de tal manera que, las concentraciones agotadas de calcio disminuirían la liberación de acetilcolina, afectando la unión excitación-contracción (97).

La actividad de los flavonoides frente a una gran variedad de microorganismos, probablemente se deba a que forman complejos con las proteínas solubles y extracelulares, y por formar complejos con la pared celular bacteriana. Además, muchos flavonoides lipofilicos pueden alterar las membranas microbianas (98).

III. MATERIALES Y METODOS

1. LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Instituto de Investigación en Química Biológica, Microbiología y Biotecnología “Marco Antonio Garrido Malo” Sección de Microbiología y Parasitología “Simón Pérez Alva”, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, y en las instalaciones de una crianza domiciliaria de cuyes en la localidad de Ayancocha, en la Provincia de Ambo.

2. MATERIAL BIOLÓGICO

2.1 GUAYABO

Se colectaron hojas maduras de guayabo entre los meses de Setiembre y Octubre del 2003, correspondiendo este periodo a la época de floración. La recolección se realizó en horas de la mañana, de guayabos que crecían en forma natural en el Distrito de Santa María del Valle, el cual se sitúa al Norte y Noreste, y a 12 Km de la capital de la Provincia de Huánuco. Pertenece a la región yunga fluvial, y se encuentra a una altitud de 1916 msnm.

La especie fue corroborada por la Jefa del Herbario San Marcos del Museo de Historia Natural – UNMSM (Anexo 1).

2.2 COBAYOS

Los animales seleccionados para el presente estudio procedían de una granja semitecnificada, en la cual se desató un brote de salmonelosis. Los animales enfermos pertenecían principalmente a la etapa de recría (21 a 30 días). No hubo distinción con respecto al linaje o al sexo.

El diagnóstico etiológico fue confirmado por el Laboratorio de Enteropatógenos del Instituto Nacional de Salud (Anexo 2).

Se apartaron seis pozas, en cada una de las cuales se colocaron 10 animales (9 hembras y un macho). Recibieron alimento concentrado y agua *ad libitum*.

Cuadro 3. Relación de equipos y materiales empleados en el presente estudio

EQUIPOS	MATERIALES	REACTIVOS E INSUMOS
<p>Molino de cuchillas Whilley Mill, con tamiz de 1 mm de porosidad</p> <p>Evaporador rotatorio R-114, BUCHI/Waterbath B-480, BUCHI</p> <p>Stirring hot plate Thermix®, Model 610T, Fisher Scientific</p> <p>Incubadora Memmert</p> <p>Vortex</p> <p>Autoclave</p> <p>Hornilla eléctrica</p> <p>Balanza digital Scout Pro 600 x 0,1 g OHAUS®</p> <p>Termómetro de 250 °C</p>	<p>Matraz redondo 500 mL</p> <p>Matraz Erlenmeyer 500 mL</p> <p>Vaso de precipitado 500 mL</p> <p>Probeta</p> <p>Embudos de vidrio</p> <p>Refrigerante para agua 24/40 con mangueras</p> <p>Frascos color ámbar con tapa rosca</p> <p>Cajas Petri de 9 cm de diámetro</p> <p>Tubos de ensayo</p> <p>Gradillas</p> <p>Soporte Universal</p> <p>Pinza de tres dedos con nuez</p> <p>Malla con asbesto</p> <p>Papel filtro Whatman® N° 2</p> <p>Filtros Whatman® Puradise™ 25AS, 0,45µm</p> <p>Micropipetas y tips</p> <p>Aguja y asa de Kolle</p> <p>Jeringas de tuberculina</p> <p>Sonda</p>	<p>Etanol 70 %</p> <p>Trypticase soy agar. Difco Laboratories</p> <p>Salmonella Shigella Agar. Difco Laboratories</p> <p>Discos de sensibilidad. EMV. Lote 2002 Que discos indicar</p>

2.3 CEPA BACTERIANA

Las cepas bacterianas empleadas en el presente estudio fueron *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Salmonella enterica* ser. Typhimurium (NLEP-PAHO CaB4). Las tres primeras, procedentes del Instituto Nacional de Salud (INS), y la última, procedente del Servicio Nacional de Seguridad Agraria (SENASA).

3. METODOS

3.1 ESTUDIO FISICO-QUIMICO

a. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Regidos a las normas básicas de recolección y cosecha de plantas medicinales (99) (Figura 1).

- Recolección: Hojas maduras
- Selección: Se apartaron las hojas enfermas de las aparentemente sanas.
- Secado: Bajo sombra a temperatura ambiente (24 °C)
- Molido: Pulverizado hasta partículas de 0,5 mm
- Conservación: Frascos limpios secos de color ámbar con tapa hermética.

b. CLASIFICACIÓN

Realizado en el Herbario de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, según el Sistema de Cronquist, que es un esquema de clasificación para plantas con flor (Angiospermas) (100).

c. EXTRACCIÓN

Métodos: Extracción continua a reflujo (101) y maceración (102). Empleando, en ambos casos etanol como solvente de extracción (103).

Procedimiento: Para cualquiera de los métodos empleados se mezclaron 20 gr de hojas pulverizadas de guayabo con 180 mL de etanol al 70 %. Para el caso de extracción continua a reflujo, este se realizó durante una hora a 60 °C, y para el caso de la maceración requirió un tiempo de 7 días. Los extractos así obtenidos, fueron filtrados a través de papel filtro Whatman N° 2, y concentrados mediante rotavapor a 30 °C. Los extractos fluidos terminaron de concentrarse sobre un calefactor hasta obtener un extracto seco. Finalmente se pesó y conservó en lugar seco y protegido de la luz.

d. FITOQUÍMICA

Reacciones de coloración para la detección de compuestos orgánicos (104):

- Reactivo de Molisch para monosacáridos. El ácido sulfúrico con las pentosas y hexosas da furfural ó 5-(hidroximetil)-furfural. Estos furfurales se condensan con α -naftol formando cromógenos, que con el ácido sulfúrico dan compuestos quinoideos de color violeta.
- Cloruro férrico para fenoles y ácidos hidroxámicos. Los fenoles reaccionan con el tricloro de hierro (FeCl_3) para dar sales férricas fenoxídicas coloreadas (azul-verde-violeta). Los ácidos hidroxámicos presentan coloración roja.
- Reactivo de gelatina-sal para taninos. Ocurre la hidrólisis del tanino dando un compuesto fenólico y un azúcar.
- Ninhidrina para aminoácidos, sales de amonio y anilina. Los alfa aminoácidos en solución acuosa calentados en presencia de ninhidrina producen un color azul-violeta. La ninhidrina reacciona con

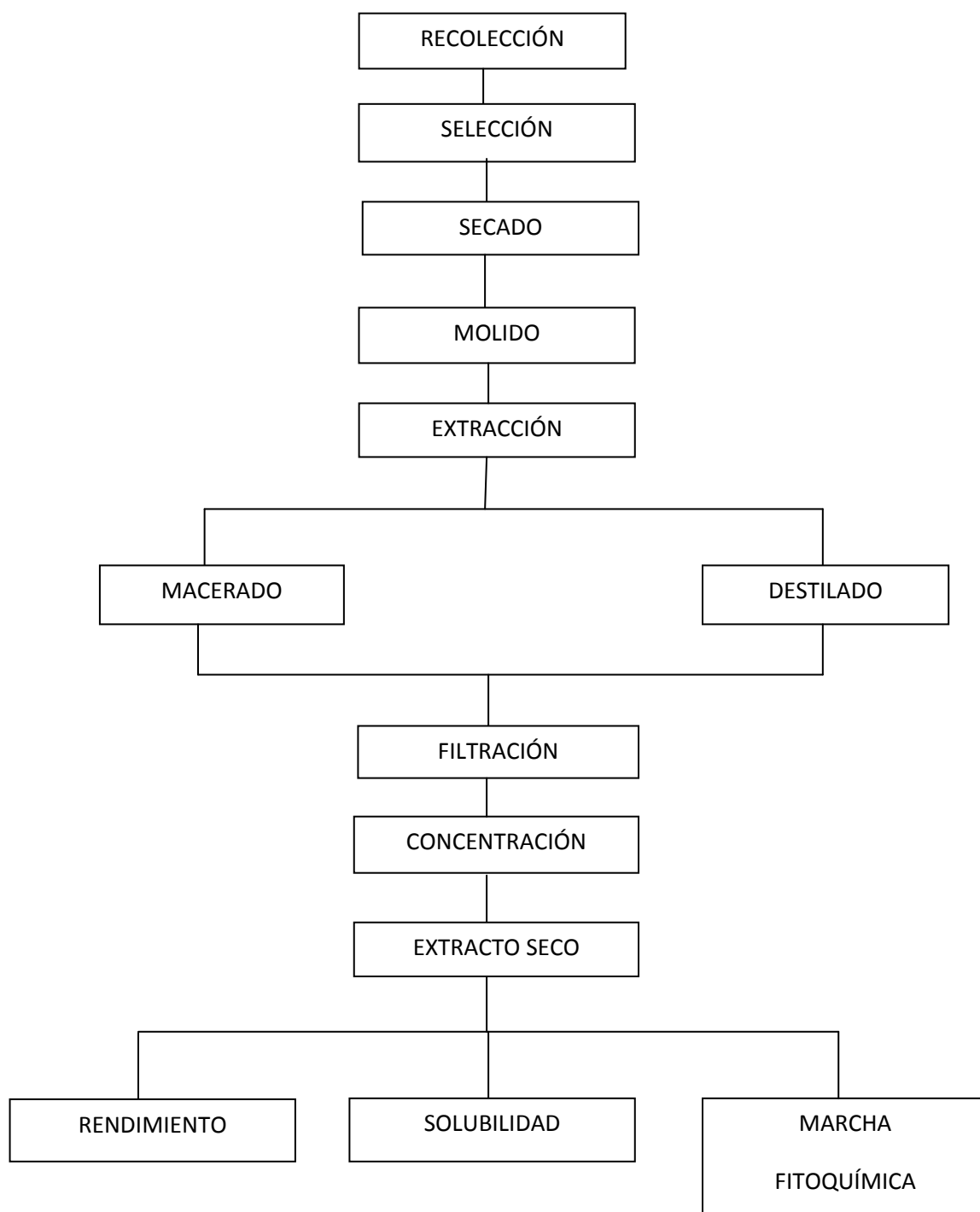


Figura 1. Flujograma que señala el proceso para la preparación de los extractos, a partir de la especie botánica recolectada.

el aminoácido formando una base de Schiff, la que se descompone liberando anhídrido carbónico, dando el 2-amino-1,3-diceto hidrindeno y un aldehído. La aminodicetona (a un pH adecuado) se condensa con la ninhidrina dando un producto coloreado.

- Prueba de Shinoda para flavonoides. Los flavonoides al ser tratados con ácido clorhídrico y magnesio dan complejos coloreados (de rojo pálido a oscuro). Al añadir un poco de alcohol isoamílico y agitar, el color pasa a la capa isoamílica.

- Reactivo de Bornträger para naftoquinonas, antraquinonas, antronas o antranoles. Las soluciones bencénicas de naftoquinonas, antraquinonas, antronas o antranoles son amarillas y colorean de rojo las soluciones alcalinas. La presencia de varios hidroxilos o dobles enlaces conjugados tienen un efecto batocrómico

- Reactivo de Liebermann-Burchard para esteroides y glicósidos triterpénicos. Ocurre una deshidratación con formación de un doble enlace conjugado a un segundo doble enlace, lo que da un producto coloreado.

- Vainillina-Ácido sulfúrico para alcoholes superiores, fenoles, esteroides y aceites etéreos. Formación de derivados coloreados. Este reactivo detecta desde hidrocarburos hasta esteroides sustituidos. El rango de coloraciones que se presenta es muy amplio y aparecen coloraciones de todo el espectro.

- Reactivo de Dragendorff para alcaloides y aminas terciarias. Formación de yoduro doble colorido y en algunos casos insoluble, de fórmula general $\text{BiI}_3 \cdot \text{B} \cdot \text{HI}$, donde B es la molécula de alcaloide.

- Reactivo de Mayer para alcaloides. Precipitación con un ion grande, formación de un yoduro doble, de fórmula general $\text{HgI}_2 \cdot \text{B} \cdot \text{HI}$, donde B es la molécula de alcaloide (precipitado blanco).

- Hidróxido de sodio para cumarinas volátiles. Las cumarinas son sustancias fluorescentes y comúnmente fotosensibles. Como son lactonas se pueden disolver en soluciones alcalinas acuosas o alcohólicas con aparición de una coloración amarilla que presenta fluorescencia azul bajo la luz UV.
- Prueba de espuma para saponinas esteroides y saponinas triterpenoides. Las saponinas tienen la propiedad de disminuir la tensión superficial del agua, por lo que sus soluciones acuosas producen espuma, de manera similar al jabón.

3.2 ESTUDIO TOXICOLÓGICO

Método: Determinación de la dosis letal media (DL₅₀), según el método clásico de toxicidad aguda (105).

Procedimiento: Se toma como punto de partida la dosis límite de 2000 mg/kg de peso corporal del animal, si esta produce mortalidad se continua con la dosis de 500 mg/kg o 200 mg/kg de ser necesario. La dosis es administrada vía oral, por única vez, tras haber sometido a los animales a ayuno toda la noche. Los animales son observados dos veces al día, durante 14 días, tiempo en el cual se registrara todo aquel signo que revele toxicidad (Figura 2).

3.3 ESTUDIO MICROBIOLÓGICO

Se realizo por el método de difusión en agar (106). Mediante la técnica de excavación de pocillos de 6 mm de diámetro. Este método fue utilizado tanto para determinar la actividad antimicrobiana, como la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto de hojas de guayabo (107).

PROCEDIMIENTO:

a. Preparación de los inóculos: Cuatro cepas referenciales, correspondientes a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella typhimurium* (NLEP-PAHO CaB4) y *Escherichia coli* (ATCC 25922), de no mas de 16 horas de incubación, fueron

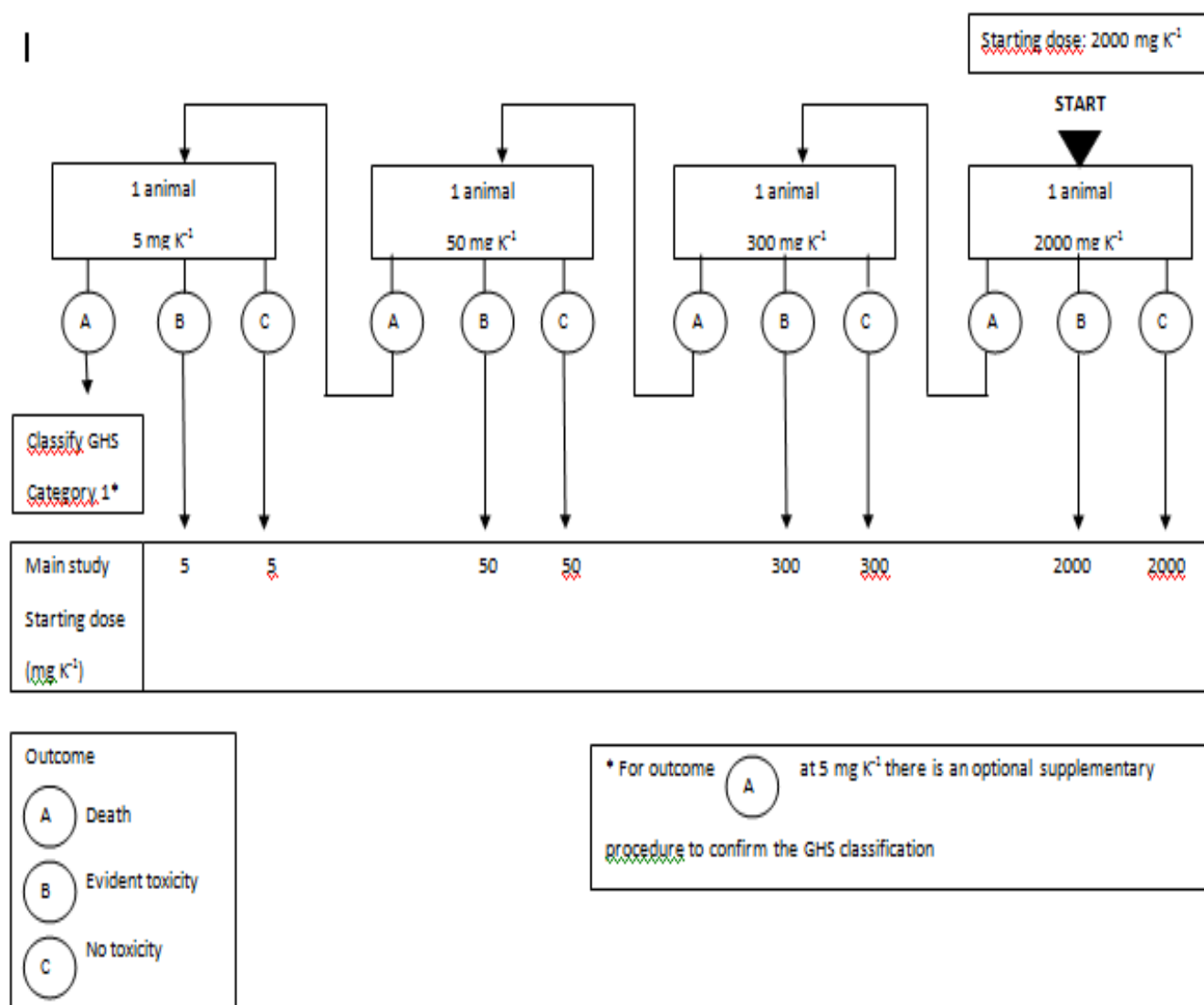


Figura 2. Flujograma que señala los procedimientos para la obtención de la DL₅₀

suspendidas en suero fisiológico estéril hasta alcanzar una concentración equivalente a 0,5 de la escala de Mac Farland.

b. Preparación del antibiótico: Gentamicina fue usada, tanto en la prueba de actividad antimicrobiana en forma de disco (10 μg), como en la prueba de CMI para lo cual se tuvo que preparar diluciones seriadas dobles, a partir de una solución stock de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en agua destilada estéril. Tales diluciones quedaron constituidas de la siguiente manera: 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 1,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 0,63 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 0,32 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

c. Reconstitución del extracto seco: Se preparó una solución stock a razón de 100 mg mL^{-1} en etanol 70 %. A partir de esta concentración se prepararon diluciones seriadas dobles, cuya serie definitiva fue determinada por ensayos previos, quedando finalmente constituida de la siguiente manera: 6,5 mg mL^{-1} ; 3,12 mg mL^{-1} ; 1,56 mg mL^{-1} ; 0,78 mg mL^{-1} ; 0,39 mg mL^{-1} . Antes de ser utilizados los extractos debieron ser esterilizados, haciendo uso de filtros de 0,45 μm de porosidad.

d. Preparación del medio de cultivo: Luego de la preparación del agar tripticasa de soya (TSA), de acuerdo a las indicaciones del fabricante, se inoculo las suspensiones de microorganismos de prueba cuando la temperatura del agar alcanzo la temperatura de 45 °C y luego se distribuyo en las placas Petri.

e. Actividad antimicrobiana: En condiciones de suma esterilidad, se tomó 0,2 mL de cada una de los inóculos y se colocaron en las cajas Petri por triplicado, seguidamente se vertió sobre ellos 25 mL de TSA, y de inmediato se procedió a girar las placas en sentido horario y antihorario (20 veces), de tal forma que se logra una buena homogenización. Luego de esperar 30 minutos hasta su completa solidificación, se procedió a realizar tres pocitos, con un sacabocado de acero inoxidable estéril de 6 mm de diámetro interno. En dos de ellos se colocaron 100 μL de una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ de extracto seco producto de la maceración y del reflujo de hojas de guayabo respectivamente; mientras que en el tercero se colocó 100 μL de etanol 70 %

(control negativo). Además, se reservó un espacio para incluir un disco de sensibilidad correspondiente a gentamicina (control positivo) (Figura 3).

f. Concentración mínima inhibitoria (CMI): Se procedió de la misma manera que para la prueba de actividad antimicrobiana, con la diferencia que se realizaron cuatro pocitos, en los cuales se incluyeron 100 µL de cada una de las diluciones del extracto que revelara mayor actividad antimicrobiana. Seguidamente, las cajas Petri se dejaron reposar por una hora, para favorecer la difusión de los extractos y luego se llevaron a incubar por 24 horas a 37 °C (Figura 4).

INTERPRETACIÓN:

- a. De acuerdo al tamaño del diámetro del halo de inhibición del crecimiento del microorganismo.
- b. De acuerdo al cálculo del porcentaje del efecto inhibitorio relativo (EIR), respecto al control positivo:

$\text{EIR} = \frac{\text{Promedio diámetro halo de inhibición}}{\text{Promedio diámetro halo inhibición control positivo}} \times 100$

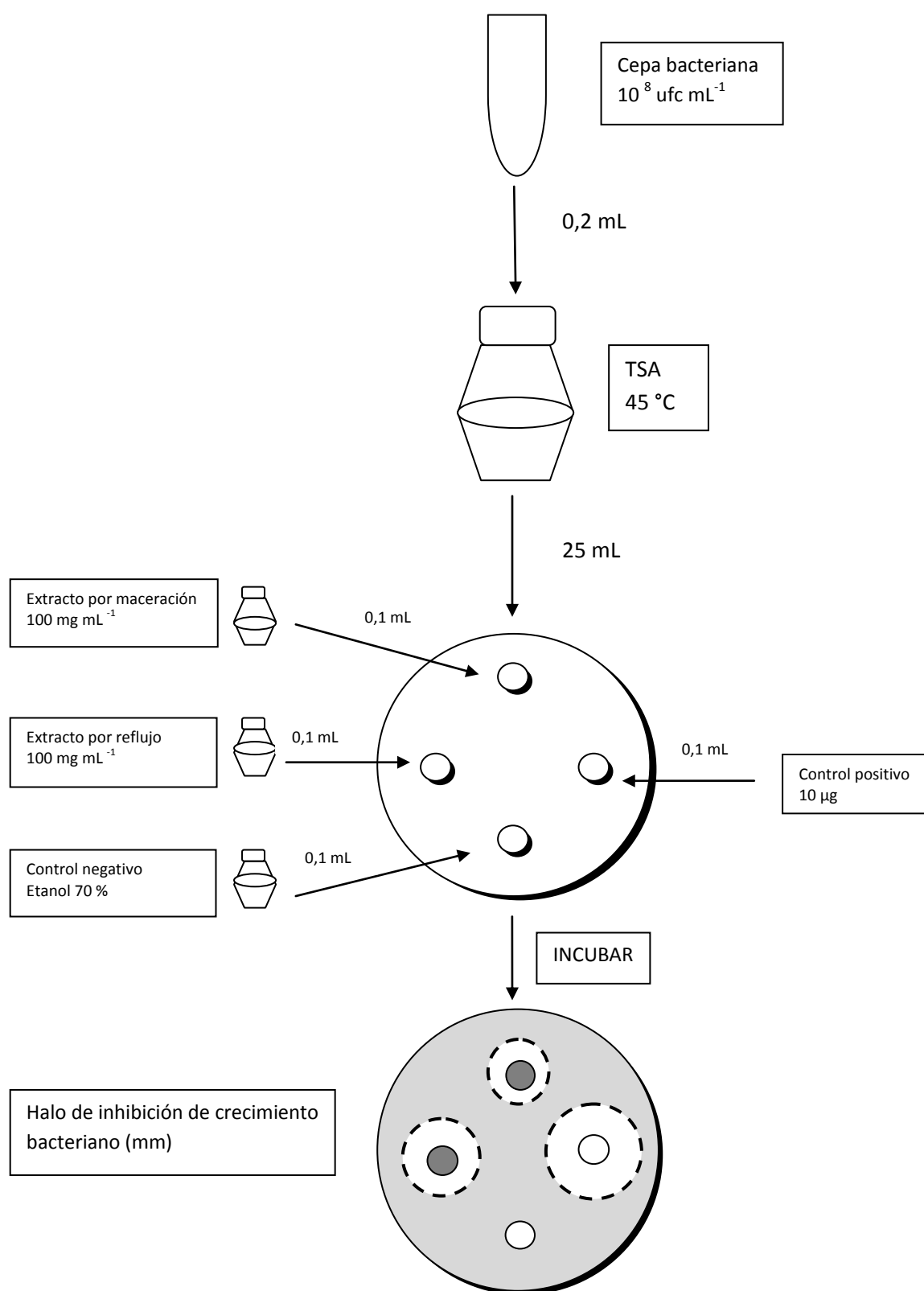


Figura 3. Método de difusión en fosas en agar para demostrar actividad antimicrobiana.

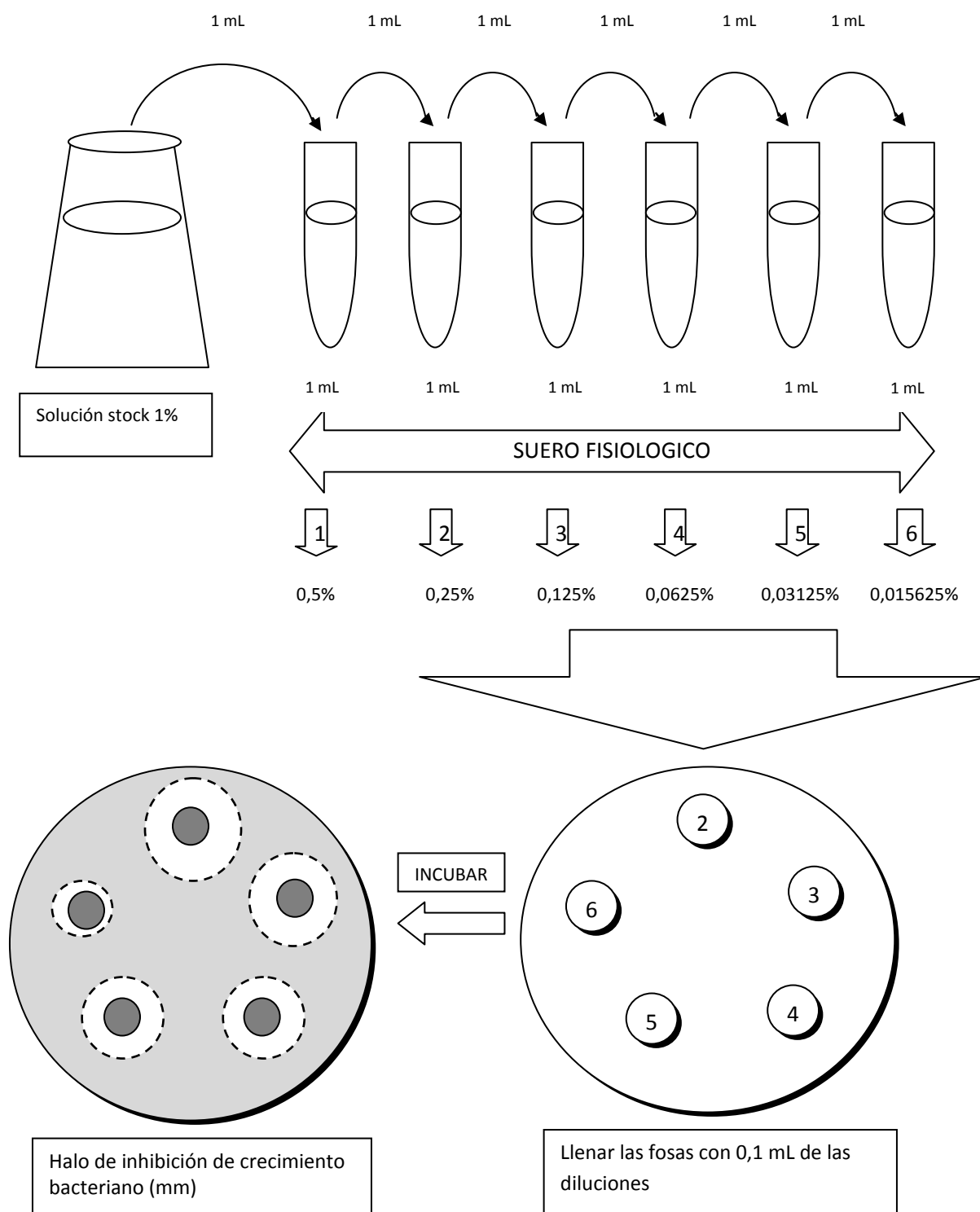


Figura 4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria, mediante diluciones seriadas dobles y método de difusión en fosas en agar.

3.4 ESTUDIO FARMACOLÓGICO

a. INFECCIÓN

El desarrollo de la enfermedad se presentó de manera disímil, en cada uno de los grupos experimentales, por lo que fue necesario uniformizar criterios para la selección de los cobayos para el estudio farmacológico. Basado en la signología, decidí utilizar la diarrea, como principal criterio de selección, y así dar inicio a la terapéutica. Para corroborar que, lo que me manifestaba la clínica obedecía a la presencia de *Salmonella* Typhimurium, se remitieron cepas de campo al Instituto Nacional de Salud para el control de calidad.

b. GRUPOS EXPERIMENTALES

Se conformaron seis grupos experimentales con diez unidades experimentales cada uno:

T₁= Animales infectados con *Salmonella enterica* ser. Typhimurium y tratados con 100 mg mL⁻¹ de extracto etanólico obtenido por maceración.

T₂= Animales infectados con *Salmonella enterica* ser. Typhimurium y tratados con 200 mg mL⁻¹ de extracto etanólico obtenido por maceración.

T₃= Animales infectados con *Salmonella enterica* ser. Typhimurium y tratados con 100 mg mL⁻¹ de extracto etanólico obtenido por reflujo.

T₄= Animales infectados con *Salmonella enterica* ser. Typhimurium y tratados con 200 mg mL⁻¹ de extracto etanólico obtenido por reflujo.

C₊ = Animales infectados con *Salmonella enterica* ser. Typhimurium y tratados con gentamicina a razón de 40 mg K⁻¹

C₋ = Animales infectados con *Salmonella enterica* ser. Typhimurium.

c. TERAPÉUTICA

La administración de las diferentes soluciones, tanto problema como control, se realizó a través de una sonda orogástrica, la cual se confeccionó adosando una sonda de 10 cm x 4 mm a la boquilla de una jeringa de tuberculina.

La concentración de la dosis se determinó a partir de los ensayos *in vitro*, y la dosis propiamente dicha fue 1 mL/día/5 días.

d. INTERPRETACIÓN

- Básicamente la valoración de mis resultados giró en torno a la curación clínica de los animales con salmonelosis. Siendo la fiebre (42 °C), ascitis, diarrea y emaciación los signos clínicos patentes de la enfermedad, se esperaba que estos revertieran para declarar al animal “curado”.

- No obstante, se comprobó si hubo curación bacteriológica. Mediante la técnica de siembra en placas en profundidad, se determinó las unidades formadoras de colonias (UFC) de muestras fecales obtenidas al inicio y al final del tratamiento.

4. DISEÑO EXPERIMENTAL

El presente trabajo de investigación se sujeto al siguiente diseño experimental:

O1	X	O2
----	---	----

Donde:

O1= Animales con salmonelosis

O2= Animales curados (clínica y bacteriológica)

X= Extracto de hojas de guayabo

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A través de parámetros, promedios y desviación estándar, según la descripción estadística inferencial, se tendrá capacidad para aceptar o rechazar la hipótesis, que otorga propiedades antimicrobianas a las hojas de guayabo para el control de salmonelosis en cobayos.

Se utilizó la significancia de Chi cuadrado, con el error de $\alpha = 0,05$

IV. RESULTADOS

1. RENDIMIENTO

La extracción a partir de una solución de 20 gr de hojas pulverizadas de guayabo en 180 mL de etanol 70%, tuvo como resultado la obtención de 5,7 gr de extracto seco por maceración, y 4,9 gr por reflujo, lo cual significa un rendimiento de 28,4 % y 24,4 % respectivamente.

2. MARCHA FITOQUIMICA PRELIMINAR

El perfil fitoquímico de los extractos de hojas de guayabo está señalado en el Cuadro 4. En el se puede apreciar que hay cierta homogeneidad cualitativa a los compuestos químicos. Sin embargo, el extracto etanólico de hojas de guayabo obtenido por reflujo tuvo la ventaja de poseer en su composición triterpenoides y compuestos fenólicos.

3. ESTUDIO TOXICOLÓGICO

El análisis toxicológico para demostrar toxicidad oral aguda, del extracto etanólico de hojas de guayabo obtenido por reflujo, demostró que la DL_{50} fue mayor a 2000 mg K^{-1} de peso (Anexo 3).

4. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Los resultados de la actividad antimicrobiana de los extractos de hojas de guayaba están expresados en el Cuadro 5.

La actividad antimicrobiana valorada, a través del método de difusión en agar, mediante la técnica de excavación o pocitos, evidenció una mayor actividad antimicrobiana por parte del extracto etanólico de hojas de guayabo, obtenido por reflujo (Foto 1 y Foto 2).

Los cuatro microorganismos de prueba desafiados, mostraron sensibilidad tanto al extracto por reflujo, como al extracto por maceración. De ellos, el que expresó mayor inhibición de su crecimiento fue *Pseudomonas aeruginosa* (EIR= 101,43).

Cuadro 4. Marcha fitoquímica preliminar de los extractos de hojas de guayabo (*Psidium guajava* L.)*

COMPOSICIÓN	VALORACIÓN CUALITATIVA	
	MACERADO	REFLUJO
Azúcares (en general)	+	+
Azúcares reductores	+	+
Compuestos fenólicos	-	+
Taninos	+++	+++
Taninos condensados	+	+
Taninos hidrolizables	-	-
Proteínas, aminoácidos o grupos aminos	-	-
Flavonoides	+	+
Heterósidos antraquinónicos	-	+
Triterpenoides	-	+
Esteroides	-	-
Saponinas	+++	+++
Glicósidos	+++	+++
Alcaloides:		
Reactivo de Dragendorff	++	++
Reactivo de Mayer	++	++

*Laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM, 2005

Cuadro 5. Actividad antimicrobiana de los extractos de hojas de guayabo (*Psidium guajava* L.) contra algunas cepas referenciales*.

MICROORGANISMOS	EXTRACTO ¹				Control Positivo ²		Control Negativo ³	
	Macerado		Reflujo		D	I	D	I
	D	I	D	I	(mm)	(%)	(mm)	(%)
	(mm)	(%)	(mm)	(%)				
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	18	78,3	19	82,6	23	100	0	0
<i>Salmonella typhimurium</i> (NLEP-PAHO CaB4)	16,7	72,6	19	82,6	23	100	0	0
<i>Pseudomona aeruginosa</i> (ATCC 27853)	19,3	80,4	21,3	88,8	21	100	0	0
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	17,7	73,8	19,6	81,7	24	100	0	0

*= Todos los valores expresan el promedio de tres réplicas; 1= 100 mg mL⁻¹; 2= Gentamicina (10 µg mL⁻¹); 3= Etanol 70%; D= Diámetro del halo de inhibición; I= Efecto inhibitorio relativo.

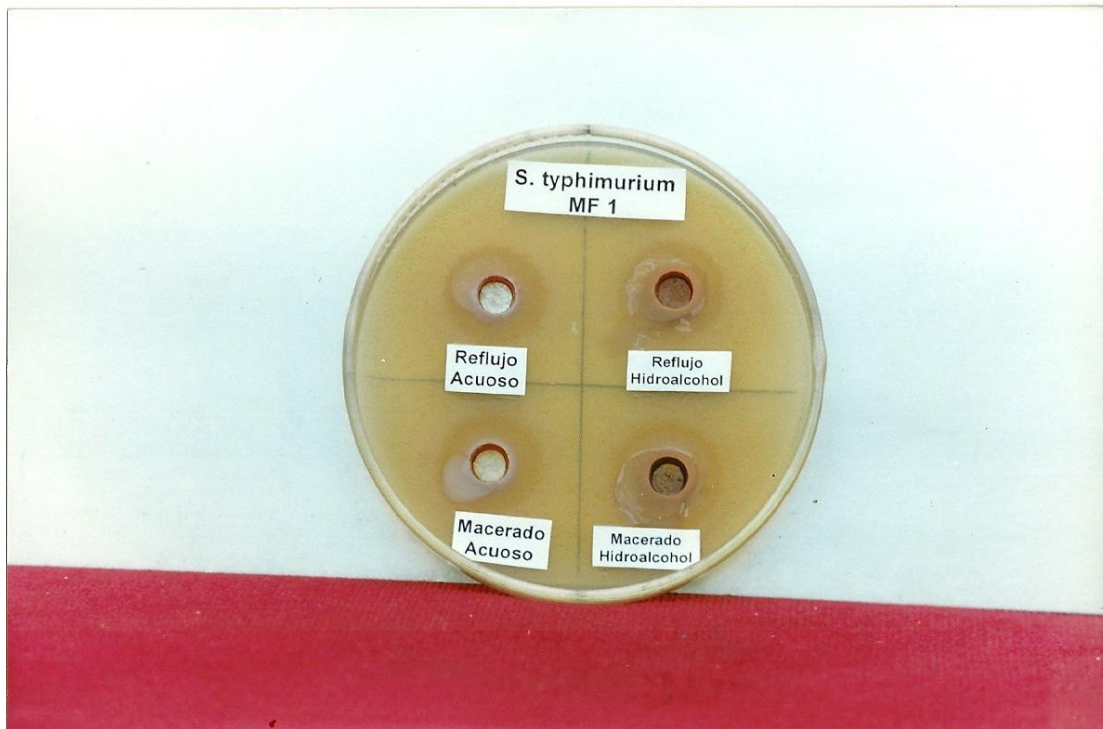


Foto 1 Actividad antimicrobiana de diferentes tipos de extracto de hojas de guayabo contra *Salmonella typhimurium*.

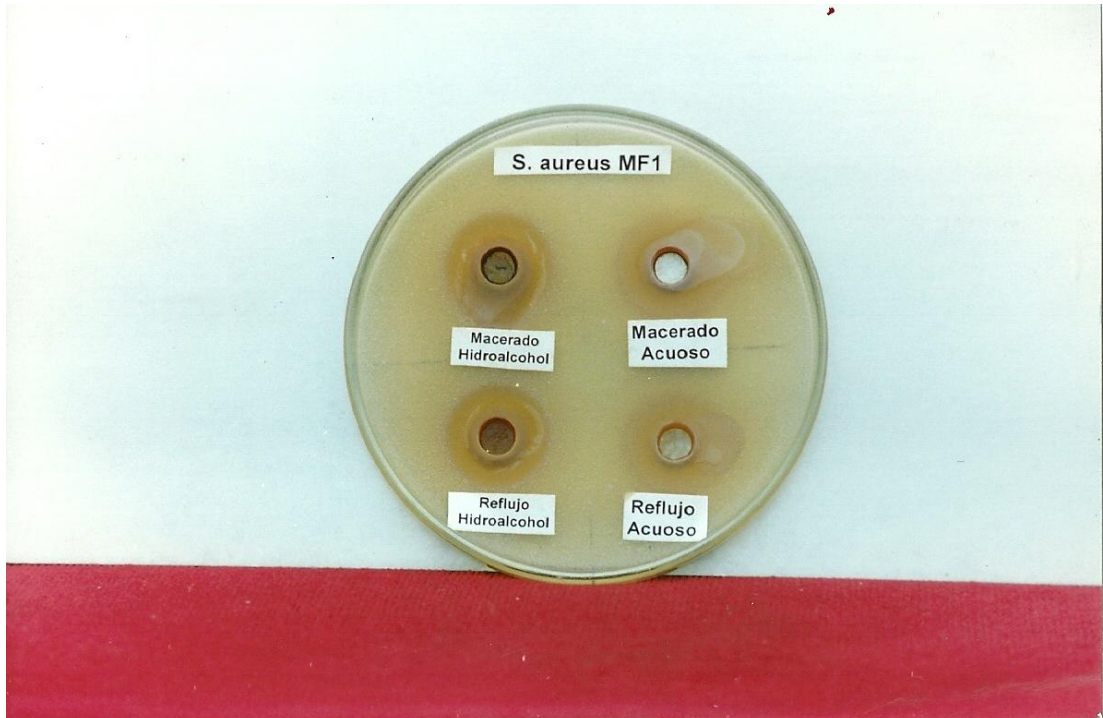


Foto 2 Actividad antimicrobiana de diferentes tipos de extracto de hojas de guayabo contra *Staphylococcus aureus*.

5. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

El extracto etanólico de hojas de guayaba obtenido por reflujo, obtuvo los mejores valores de CMI con respecto a *Salmonella enterica* ser. Typhimurium, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, mas no así para *Staphylococcus aureus*, para el cual fue igual que el extracto por maceración.

En relación al extracto por reflujo, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* requirieron menor CMI ($780 \mu\text{g mL}^{-1}$), que *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* ser. Typhimurium ($1560 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Cuadro 6. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos de hojas de guayabo (*Psidium guajava* L.) contra algunas cepas referenciales.

MICROORGANISMO	CMI ¹		
	Macerado ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Reflujo ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Control ² ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	780	780	5,0
<i>Salmonella typhimurium</i> (NLEP-PAHO CaB4)	2600	1560	5,0
<i>Pseudomona aeruginosa</i> (ATCC 27853)	1040	780	2,5
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	2600	1560	2,5

1= Promedio de tres replicas; 2= Gentamicina.

5. ESTUDIO FARMACOLÓGICO

El Cuadro 7 muestra la respuesta farmacológica de los animales con salmonelosis, al ser tratados con diferentes concentraciones y extractos de hojas de guayabo. En el mismo se puede apreciar que, el extracto etanólico por maceración es igual de efectivo que el extracto etanólico por reflujo. Sin embargo, la potencia difiere a favor de los 100 mg mL⁻¹ del extracto etanólico por reflujo, el cual recupera al total de los animales en estudio al cuarto día de tratamiento, con respecto a la misma concentración de extracto etanólico por maceración, el cual recupera al total de animales en estudio al quinto día de tratamiento. Además, en lo que respecta a la curación clínica de los animales con salmonelosis, los 200 mg mL⁻¹ del extracto etanólico por reflujo tuvo similar resultado que la gentamicina, al resolver los casos al tercer día del tratamiento.

Cuadro 7. Proceso de recuperación de los cuyes con salmonelosis durante el estudio farmacológico con diferentes concentraciones y extractos de hojas de guayabo (*Psidium guajava* L).

Grupos	Días de tratamiento										Total	
	1		2		3		4		5			
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
T ₁	-	-	-	-	3	30	3	30	3	30	9	90
T ₂	-	-	-	-	4	40	4	40	2	20	10	100
T ₃	-	-	4	40	4	40	2	20	-	-	10	100
T ₄	2	20	4	40	4	40	-	-	-	-	10	100
CP	6	60	3	30	1	10	-	-	-	-	10	100
CN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0

T₁= Animales con salmonelosis tratados con 1 mL de extracto de hojas de guayabo obtenido por maceración a razón de 100 mg mL⁻¹; T₂= Animales con salmonelosis tratados con 1 mL de extracto de hojas de guayabo obtenido por maceración a razón de 200 mg mL⁻¹; T₃= Animales con salmonelosis tratados con 1 mL de extracto de hojas de guayabo obtenido por reflujo a razón de 100 mg mL⁻¹; T₄= Animales con salmonelosis tratados con 1 mL de extracto de hojas de guayabo obtenido por reflujo a razón de 200 mg mL⁻¹; CP= Animales con salmonelosis tratados con gentamicina (40 mg K⁻¹); CN= Animales con salmonelosis sin tratamiento.

El Cuadro 8 muestra la respuesta microbiológica de los animales con salmonelosis, al tratamiento con diferentes concentraciones y extractos de hojas de guayabo. En este se puede apreciar que, tras cinco días de tratamiento, el promedio del recuento bacteriano se redujo de 276 ufc mL⁻¹ a 97 ufc mL⁻¹.

Cuadro 8. Recuento bacteriano en cuyes con salmonelosis, durante el estudio farmacológico con diferentes concentraciones y extractos de hojas de guayabo (*Psidium guajava* L).

GRUPOS	RECuento BACTERIANO (UFC/ mL)*	
	PRE CONTROL ¹	POST CONTROL ²
T ₁	285	97
T ₂	293	95
T ₃	277	97
T ₄	247	99
C+	280	97

*= Promedio de cinco animales (dilución de 10⁻⁶); 1= Recuento al primer día de tratamiento; 2= Recuento al quinto día de tratamiento.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

7.1 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

El efecto inhibitorio relativo (EIR) revela, que tanto el extracto por reflujo, como el extracto por maceración superan el 50 % de eficacia del control positivo (Gentamicina). Sin embargo, entre los dos extractos, el obtenido por reflujo alcanza un EIR promedio de 87,08 %, superior al 79,13 % alcanzado por el extracto por maceración.

Realizado el análisis de varianza, se observó diferencia estadística entre el resultado expresado por los extractos etanólicos por maceración y por reflujo ($P \leq 0,05$); por el contrario, no existe diferencia estadística entre el resultado puesto de manifiesto por cada uno de los microorganismos desafiados ($P \leq 0,05$).

La prueba de comparación de promedios (Prueba de Duncan, $P \leq 0,05$) revela que el resultado, expresado en el tamaño del halo de inhibición, difiere entre los extractos y el control positivo, siendo el orden ascendente el siguiente: 1º macerado, 2º reflujo y 3º control positivo.

7.2 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

No fue necesario emplear pruebas estadísticas porque simplemente la CMI precisa una cantidad con la que, determinada sustancia, obtiene un efecto; en este caso, se añade un valor al ya obtenido en el análisis de actividad antimicrobiana, para el cual las pruebas estadísticas demostraron que existe diferencia entre el extracto por maceración y por reflujo.

7.3 ESTUDIO FARMACOLÓGICO

La prueba de Chi cuadrado para la respuesta farmacológica de los animales con salmonelosis, tratados con diferentes concentraciones y extractos de hojas de guayabo, demuestra que $X^2 = 1,530$ es mayor que $p = 0,05$; por lo tanto, se acepta la hipótesis de investigación, lo que significa que el extracto etanólico de hojas de guayabo obtenido por reflujo, es competitivo con la droga

comercial de elección para el tratamiento de la salmonelosis en cuyes; y por consiguiente, una alternativa natural ha ser empleada en la terapéutica veterinaria.

La desviación estándar para la respuesta microbiológica de los animales con salmonelosis tratados con diferentes concentraciones y extractos de hojas de guayabo, demuestra que $s_2 = 9,85$ es menor que $s_1 = 16,63$; por lo tanto, sumado a la curación clínica, también hubo curación bacteriológica.

V. DISCUSIÓN

1. RENDIMIENTO

La cantidad de extracto seco obtenido a partir de la extracción por reflujo y maceración de hojas de guayabo fue 24,4 % y 28,4 % respectivamente. Existe cierta correspondencia con otros autores, en el sentido que los métodos de extracción discontinuos producen mejores rendimientos que los métodos continuos. El extracto acuoso por Soxhlet obtuvo un rendimiento de 9,9 %, mientras que el del extracto metanólico por maceración fue 11,6 % (40). También se puede apreciar una marcada diferencia, dependiendo del tipo de solvente. El rendimiento obtenido por maceración de corteza de guayabo con éter-petróleo, agua y metanol fue 3,12 %, 13,59 %, 72,25 % respectivamente (108). Todos estos resultados, ratifican el carácter hidrosoluble que poseen los componentes de las hojas de guayabo; y los mejores rendimientos obtenidos, no son otra cosa más que el resultado de una armoniosa asociación con el solvente que mejor pueda extraerlos.

2. MARCHA FITOQUÍMICA

La diferencia encontrada entre el extracto de hojas de guayabo obtenido por reflujo y el obtenido por maceración, radica en la presencia de triterpenoides y compuestos fenólicos en el primer extracto y no en el segundo.

Considerando los principios de solubilidad de los flavonoides, se puede afirmar que los obtenidos en el extracto de hojas de guayaba, en el presente estudio, corresponden a la forma aglicones libres (109).

Los flavonoides varían por la época del año, incidencia de luz y características edáficas (110). Estas consideraciones son oportunas, toda vez que la recolección de hojas de guayabo fue realizada entre los meses de setiembre y octubre, meses que corresponden a la época de sequía en la provincia de Huánuco, y por consiguiente la disminución del contenido foliar de flavonoides. Este fenómeno podría tener otra explicación, basado en la biosíntesis de los flavonoles, los cuales son precursores de los taninos (111). En este sentido, la pobre cantidad de

flavonoides, de los extractos, respondería a la gran cantidad de taninos encontrado en el presente estudio.

3. ESTUDIO TOXICOLÓGICO

El resultado a la prueba de toxicidad oral aguda en ratas, a la que sometió el extracto de hojas de guayabo, es el mismo al obtenido en La Habana, Cuba (112), el cual refiere que es seguro a la concentración de 2000 mg K⁻¹.

4. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Está demostrado que la actividad antimicrobiana de las plantas medicinales depende de los componentes que esta posee, y por consiguiente, del solvente apropiado que se elija para obtenerlos (113, 103). En este sentido, la elección del etanol como solvente en la obtención de extractos de hojas de guayabo, en el presente estudio, obedece a los antecedentes bibliográficos, y concuerda en el hecho de poseer una mayor actividad antimicrobiana, frente a otros solventes muy polares o menos polares. Así mismo, con el uso de extracto etanólico de hojas de guayabo, se obtuvo un halo de inhibición de 19 mm contra *Staphylococcus aureus*; mientras que otros autores, usando extracto hidro-alcoholico, obtuvieron 7 mm (114), y usando la fracción éter-petróleo obtuvieron actividad nula (115). Esta comparación, permite inferir que los componentes con actividad antimicrobiana son mayormente hidrosolubles y son extraídos por solventes polares.

La comparación entre los métodos de extracción, también revelan diferencias en la actividad antimicrobiana *in vitro*. Así, el halo de inhibición expresado por el extracto por reflujo contra *Salmonella enterica* ser. Typhimurium, fue 19 mm; mientras que otros investigadores reportaron que el macerado metanólico produjo un halo de inhibición de 10 mm (40); el macerado hidro-alcoholico, un halo de inhibición de 17,3 mm (116); y la cocción, 3 mm (117). Esta comparación sirve para comprobar, que la elección del método de difusión, para demostrar actividad antimicrobiana *in vitro*, influiría en el diámetro del halo de inhibición (118). Es así, que el método de difusión en agar mediante la técnica de excavación y pocillos, ofrece una mayor ventaja a los componentes contenidos en el extracto

para difundir en el agar, a diferencia del método de difusión por disco, empleado por los otros autores arriba citados.

Es sabido, que los hongos y las bacterias Gram negativas son menos sensibles a la acción de las plantas medicinales, que las bacterias Gram positivas (119). Sin embargo, comparando las referencias bibliográficas con lo obtenido en el presente estudio, se muestra un común denominador, toda vez que el espectro de la actividad antimicrobiana no marco una gran diferencia entre bacterias Gram negativas y Gram positivas, comparadas en similares condiciones de concentración del extracto (100 mg mL^{-1}). Además se muestran un halo de inhibición de 19 mm, 19 mm, 21,3 mm, y 19,6 mm para *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* ser. Typhimurium, *Pseudomona aeruginosa* y *Escherichia coli* respectivamente. Otros autores reportaron 12 mm, 15 mm y 16 mm para *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Escherichia coli* respectivamente (112); 17,3 mm, 12,6 mm y 15 mm para *Salmonella* sp., *Pseudomona aeruginosa* y *Escherichia coli* respectivamente (116).

La actividad antimicrobiana del reflujo de hojas de guayabo, como resultado de mi investigación, fue muy significativo, considerando que el efecto inhibitorio relativo (EIR) superó el 80%, tanto para *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* ser. Typhimurium y *Escherichia coli*; mientras que para *Pseudomona aeruginosa* supero el 100%. Otros estudios señalaron que, el EIR del percolado superó el 40%, tanto *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Escherichia coli* (112); y el macerado produjo un extracto cuyo EIR fue 120% para *Staphylococcus aureus* y 0% para *Escherichia coli* (120).

5. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

En el presente estudio, la CMI del extracto por reflujo de hojas de guayabo contra *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa* fue $0,78 \text{ mg mL}^{-1}$, y contra *Salmonella enterica* ser. Typhimurium y *Escherichia coli* fue $1,56 \text{ mg mL}^{-1}$. En otro estudio, el reflujo de hojas de guayabo mostró una CMI de $0,13 \text{ mg mL}^{-1}$ contra *Staphylococcus aureus*, y 1 mg mL^{-1} contra *Pseudomona aeruginosa* y *Escherichia coli* (121).

Nuevamente, en este punto destaca el método de extracción, como un factor que influiría en el comportamiento de la CMI. Es así que, la CMI del macerado con metanol 80% por 24 horas, y macerado con metanol 75% por 48 horas, contra *Staphylococcus aureus*, fue 4 mg mL⁻¹ (120) y 1 mg mL⁻¹ (122) respectivamente. Por otro lado, el macerado hidro-alcoholico con etanol 70% por 15 días mostró una CMI de 2,4 mg mL⁻¹ contra *Salmonella* sp y *Escherichia coli*; y 1,8 mg mL⁻¹ contra *Pseudomona aeruginosa* (116). De manera similar, el macerado hidro-alcoholico con etanol 90% por 48 horas mostró una CMI de 0,25 mg mL⁻¹, 0,50 mg mL⁻¹, y 1 mg mL⁻¹ contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, y *Pseudomona aeruginosa* respectivamente (123).

Es evidente que la asociación método de extracción-método para la puesta en marcha de la CMI, es determinante en la obtención de los mejores valores en la CMI. Es así que, la asociación reflujo-dilución se impuso sobre otros métodos.

6. ESTUDIO FARMACOLÓGICO

Quedó demostrado que la dosis de 1 mL de extracto de hojas de guayabo obtenido por reflujo, a la concentración de 200 mg mL⁻¹, administrado *per os* cada 24 horas durante cinco días, es el tratamiento que ofreció mejor resultado, toda vez que recuperó el 100% de los animales al tercer día de tratamiento, compitiendo de esta manera con la gentamicina. Estudios llevados a cabo con ratones, a los que se les indujo diarrea con aceite castor, respondieron favorablemente a la dosis de 750 mg K⁻¹ (33) y 200 mg K⁻¹ (39) a partir de extractos obtenidos por percolación con etanol y maceración con metanol respectivamente. Lo propio también se hizo con ratas, a las que se indujo diarrea con un enema comercial (Microlax[™]) y con aceite castor; obteniéndose respuesta favorable al tratamiento con extracto acuoso a la dosis de 0,86 mL 100 g⁻¹ (38), y extracto metanólico a la dosis de 400 mg K⁻¹ (40) respectivamente. Quizá la comparación sea antojadiza, toda vez que el presente trabajo de investigación fue orientado a controlar un proceso infeccioso, y no simplemente un signo clínico aislado. Sin embargo, no se descarta la posibilidad que, las dosis indicadas para controlar la diarrea en ratas y ratones sean las adecuadas para controlar algún agente enteropatógeno.

VI. CONCLUSIONES

1. La CMI para *Salmonella entérica* ser. Typhimurium fue 1,56 mg mL⁻¹ con extracto por reflujo; en cambio para el extracto por maceración fue 2,60 mg mL⁻¹.
2. El grupo experimental que recibió la dosis de 1 ml de extracto seco de hojas de guayabo obtenido por reflujo, a la concentración de 200 mg mL⁻¹, durante cinco días, fue el grupo que experimentó el mejor resultado, toda vez que mostró curación clínica absoluta al tercer día de tratamiento. De modo similar, la curación bacteriológica se hizo patente, toda vez que se redujo en más del 60% el recuento bacteriano, al quinto día de tratamiento.

VII. RECOMENDACIONES

1. Identificar los flavonoides predominantes en la especie *Psidium guajava* L. de la provincia de Huánuco.
2. Estudiar la cinética de los flavonoides en los animales domésticos.
3. Fomentar el cultivo sostenible de *Psidium guajava* L.
4. Industrialización del extracto de hojas de guayabo con fines profilácticos en la explotación de animales domésticos.
5. Estudiar la residualidad del extracto de hojas de guayabo en los subproductos de origen animal.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. De Candolle A. Origin of cultivated plants. New York: Hafner Publishing Company; 1967 p. 241-244. Citado por: Mata I, Rodríguez A. Cultivo y producción de guayabo. 2ª ed. México DF: TRILLAS; 2000.
2. Brack E. Tratado de libre comercio y biodiversidad del Perú [sitio en internet]. Disponible en: www.servindi.org/antiguo/sp/Campana_TLC/Brack_1.html Consulta: Agosto 2004.
3. Taylor L. Guava. [sitio en internet]. Disponible en: www.rain-tree.com/guava.htm Consulta: Febrero 2004.
4. Ruehle G. El cultivo de la guayaba en Florida. Agric trop. 1964; 20: 555-564 Citado por: Mata I, Rodríguez A. Cultivo y producción de guayabo. 2ª ed. México DF: TRILLAS; 2000.
5. Integrated Taxonomic Information System. *Psidium guajava* L. [sitio en internet]. Disponible en: www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_valve=27240 Consulta: Setiembre 2004.
6. Germplasm Resources Information Network. *Psidium guajava* L. [sitio en internet]. Disponible en: www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/tax_search.pl?Psidium%20guajava Consulta: Setiembre 2004.
7. Ochse J. Cultivo y mejoramiento de plantas tropicales y subtropicales, Vol I. México: LIMUSA; 1976. Citado por: Mata I, Rodríguez A. Cultivo y producción de guayabo. 2ª ed. México DF: TRILLAS; 2000.
8. Palacios V. Plantas medicinales nativas del Perú, Vol I. Lima: CONCYTEC; 1993.

9. El-Baradi T. Guava: Review article. En: Abstr Trop Agric 1975; 1: 9-16.
Citado por: Mata I, Rodríguez A. Cultivo y producción de guayabo. 2ª ed. México DF: TRILLAS; 2000.
10. Le-Bourdellès J, Estanove P. La goyave aux Antilles. En: Fruits. 1967; 22 (9): 397-412. Citado por: Mata I, Rodríguez A. Cultivo y producción de guayabo. 2ª ed. México DF: TRILLAS; 2000.
11. Yusof S, Mohamed S. Physico-chemical changes in guava (*Psidium guajava* L.) during development and maturation. J Sci Fd Agric. 1987; 38 (1): 31-39.
12. Heredia J, Siller J, Baez M, Araiza E, Portillo T, García R, Muy M. Cambios en la calidad y el contenido de carbohidratos en frutas tropicales y subtropicales a nivel de supermercado. En: Proa Interamer Soc Trop Hort. 1997; 41: 104-109. Citado por: Cañizares A, Laverde D, Puesme R. Crecimiento y desarrollo del fruto de guayaba (*Psidium guajava* L.) en Santa Bárbara, estado Monagas, Venezuela. En: Revista UDO Agrícola. 2003; 3 (1): 34-38.
13. Chen H, Sheu M, Lin L, Wu C. Volatile Constituents of six cultivars of mature guava (*Psidium guajava* L.) fruits from Taiwan. En: International Symposium on Plants as Food and Medicine: The Utilization and Development of Horticultural Plants for Human Health; Seoul, Korea 2006. Seoul: Gardner G. y Craker L. editors, 2008. p. 273-278.
14. Fluck H. The influence of climate on the active principles in medicinal plants. En: J Pharm Pharmacol. 1955; 7 (6): 361-383. Citado por: Acosta L. Principios agroclimáticos básicos para la producción de plantas medicinales. [sitio en internet] Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962003000100008&lng=es. Consulta: Setiembre 2004.

15. Surai P. Protección antioxidante en el intestino: Un buen comienzo es la mitad de la batalla. [sitio en internet]. Disponible en: www.engormix.com/nuevo/prueba/colaboraciones.asp?valor1=155 Consulta: Febrero 2007.
16. Luximon A, Bahorum T, Crozier A. Antioxidant actions and phenolic and vitamin C contents of common Mauritian exotic fruits. *J Sc Fd Agric*. 2003; 83 (5): 496-502.
17. Natale W, Coutinho E, Pereira F, Boaretto A. Nutrients foliar content for high productivity cultivars of guava in Brazil. En: International Symposium on Foliar Nutrition of Perennial Fruit Plants; Merano, Italy 10-15 September 2001. Merano: Tagliavini M., Toselli M., Bertschinger L., Brown P., Neilsen D., y Thalheimer M., editors, 2002. p. 383-386.
18. Torres A, Ricciardi G, Agrelo A, Ricciardi A. Estudio comparativo de aceites esenciales de especies de *Psidium* (Myrtaceae) del Noreste. [sitio en internet]. Disponible en: www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt/exactas/e-031.pdf Consulta: Febrero 2003.
19. Torres A, Ricciardi G, Agrelo A, Ricciardi A. Estabilidad fotoquímica de *Psidium guajava* (Myrtaceae) en la Provincia de Corrientes. [sitio en internet]. Disponible en: www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt/2001/8-Exactas/E-010.pdf Consulta: Febrero 2003.
20. Ogunwande I, Olaworw N, Adeleke K, Ekundayo O, Koenig W. Chemical composition of the leaf volatile oil of *Psidium guajava* L. growing in Nigeria. *Flavour Fragr J*. 2003; 18: 136-138.
21. da Silva J, Luz, A, da Silva M, Andrade E, Zoghbi M, Maia J. Essential oils of the leaves and stems of four *Psidium* spp. *Flavour Fragr J*. 2003; 18: 240-243.
22. Begum S, Hassan S, Siddiqui B, Shaheen F, Ghayur M, Gilani A. Triterpenoids from the leaves of *Psidium guajava*. *Phytochemistry*. 2002; 61: 399-403.

23. Arima H, Danno G. Isolation of antimicrobial compounds from guava (*Psidium guajava* L.) and their structural elucidation. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2002; 66(8): 1727-1730.
24. Vargas D, Soto M, Gonzales V, Engleman E, Martínez A. Cinética de acumulación y distribución de flavonoides en guayaba (*Psidium guajava* L.). *AGROCIENCIA.* 2006; 40: 109-115.
25. Betancourt B, Ramos R, Vizoso P, Martínez G, López B. Ausencia de actividad genotóxica del extracto fluido de *Psidium guajava* L. (guava) evaluada en un sistema de ensayo en *Aspergillus nidulans*. *Rev Cubana Plant Med.* 2000; 5 (2): 38-40.
26. Martínez M, López M, Betancourt B, Barceló P, Montes M, Regó R. Estudio toxicológico pre clínico de la *Psidium guajava* L. (guayaba). *Rev Cubana Plant Med.* 2001; 6 (2): 56-61.
27. Grover I, Bala S. Studies on antimutagenic effects of guava (*Psidium guajava*) in *Salmonella typhimurium*. *Mut Res.* 1993; 300 (1): 1-3
28. Matsuo T, Hanamure N, Shimoi K, Nakamura Y, Tomita I. Identification of (+)-galocatechin as a bio-antimutagenic compound in *Psidium guajava* leaves. *Phytochemistry.* 1994; 36 (4): 1027-1029.
29. Pardo B. Estudio comparativos de ocho especies americanas de uso medicinal en Mozambique [sitio en internet]. Disponible en: [www.chlorischile.cl/mozambique/INTRODUCCION,htm](http://www.chlorischile.cl/mozambique/INTRODUCCION.htm) Consulta: Junio 2003.
30. Arnason T, Uck F, Lambert J, Hebda R. Maya medicinal plants of San José Succtz, Belize. *J Ethnopharmacol.* 1980; 2: 345-364.
31. Lozoya X, Reyes H, Chávez M, Martinez M, Soto Y, Doubova S. Intestinal anti-spasmodic effect of a phytodrug of *Psidium guajava* folia in the treatment of acute diarrheic disease. *J Etnopharmacol.* 2002; 83: 19-24.

32. Le Grand A. Les phytotherapies anti-infectieuses de la foret-savane, Senegal (Afrique Occidentale) III: Un resume des substances phytichimiques et láctivite anti-microbienne de 43 species. J Ethnopharmacol. 1989; 25: 315-338.
33. Maïkere-Faniyo R, Van Puyvelde L, Mutwewingabo A, Habiyaemye F. Study of Rwandese medicinal plants used in the treatment of diarrhea I. J Ethnopharmacol. 1989; 26 (2): 101-109.
34. Cáceres A, Saravia A. Bioensayos con plantas medicinales en Guatemala, 1994. En: Memorias del IV Congreso Italo-latinoamericano de Etnomedicina “Felice Fontana” Vol II; Quito, Ecuador 6-9 de Noviembre de 1995. Quito: Plutarco Naranjo y Antonio Crespo editores, 1995. p. 35-48
35. Frei B, Baltesberger M, Sticher O, Heinrich M. Medical ethnobotany of the Zapotecs of the Isthmus- Sierra (Oaxaca, México): Documentation and assessment of indigenous uses. J Ethnopharmacol. 1998; 62: 149-165.
36. Hernández T, Canales M, Ávila J, Durán A, Caballero J, Romo A, Lira R. Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). J Ethnopharmacol. 2003; 88: 181-188.
37. Dobbins J, Binder H. Pathophysiology of diarrhoea: Alterations in fluid and electrolyte transport. En: Clinical Gastroenterology. 1981; 10: 605. Citado por: Lutterodt G. Inhibition of Microlax™-induced experimental diarrhea with narcotic-like extracts of *Psidium guajava* leaf in rats. En: J Ethnopharmacol. 1992; 37: 151-157.
38. Lutterodt G. Inhibition of Microlax™-induced experimental diarrhea with narcotic-like extracts of *Psidium guajava* leaf in rats. J Ethnopharmacol. 1992; 37: 151-157.
39. Olajide O, Awe S, Makinde J. Pharmacological studies on the leaf of *Psidium guajava*. Fitoterapia. 1999; 70: 25-31.

40. Lin J, Puckree T, Mvelase T. Anti-diarrheal evaluation of some medicinal plants used by Zulu traditional healers. *J Ethnopharmacol.* 2002; 79: 53-56.
41. Morón F, Martínez M, Morón D. Disminución del tránsito intestinal en ratones por tintura de guayaba (*Psidium guajava* L.) oral. *Rev Cubana Plant Med.* 1999, 3 (2): 54-56.
42. Gutiérrez Y, Miranda M, Bilbao O, de la Paz J, Rodríguez L. Suspensión oral anti diarreica de *Psidium guajava* L. *Rev Cubana Farm.* 2000; 34 (1): 44-49.
43. Almeida C, Karnikowski M, Foletto R, Baldisserotto B. Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicinal. *Rev Saúde Pública.* 1995; 29 (6): 428-433.
44. Ghosh T, Sen T, Das A, Dutta A, Nag A. Antidiarrheal activity of the methanolic fraction of the extract of unripe fruits of *Psidium guajava* Linn. *Phytotherapy Research.* 1993; 7 (6): 431-433.
45. Yeum K, Aldini G, Chung H, Krinsky N, Russell R. The activities of antioxidant nutrients in human plasma depend on the localization of attacking radical species. En: *Journal of Nutrition.* 2003; 133: 2688-2691. Citado por: Qian H, Nihorimbere V. Antioxidant power of phytochemical from *Psidium guajava* leaf. En: *J Zhejiang Univ.* 2004; 5 (6): 676-683.
46. Jimenez A, Rincón M, Pulido R, Saura F. Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. *J Agric Food Chem.* 2001; 49: 5489-5493.
47. Rahmat A, Abu B, Hambali Z. The effects of guava (*Psidium guajava* L.) consumption on total antioxidant and lipid profile in normal male youth. [sitio en internet] Disponible en: www.ajfand.net/Issue-XI-files/PDFs/RAHMAT_1335.pdf Consulta: Octubre 2006.
48. Qian H, Nihorimbere V. Antioxidant power of phytochemical from *Psidium guajava* leaf. *J Zhejiang Univ.* 2004; 5 (6): 676-683.

49. Chen H, Yen G. Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of extracts from guava (*Psidium guajava* L.) leaves. Food Chemistry. 2007; 101: 686-694.
50. Conde E, Nascimento V, Santiago A. Inotropic effects of extracts of *Psidium guajava* L. (guava) leaves on the guinea pig atrium. Braz J Med Biol Res. 2003; 36 (5): 661-668.
51. Jaiarj P, Khoahaswan P, Wongkrajang Y, Peungvicha P, Suriyawong P, Sumal M, Ruangsomboon O. Anticough and antimicrobial activities of *Psidium guajava* Linn. leaf extract. J Ethnopharmacol. 1999; 67: 202-212.
52. Santos F, Rao V, Silveira E. Investigations on the antinociceptive effect of *Psidium guajava* leaf essential oil and its major constituents. Phytotherapy Research. 1998; 12 (1): 24-27.
53. Belemtougri R, Constantin B, Cognard C, Raymond G, Sawadogo L. Effects of two medicinal plants *Psidium guajava* L. (Myrtaceae) and *Diospyros mespiliformis* L. (Ebenaceae) leaf extracts on rats skeletal muscle cells in primary culture. J Zhejiang Univ SCIENCE B. 2006; 7 (1): 56-63.
54. Manosroi J, Dhumthanom P, Manosroi A. Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. Cancer Letters. 2006; 235: 114-120.
55. Prabu G, Gnanamani A, Sadulla S. Guaijaverin-a plant flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans*. J Appl Microbiol. 2006; 101: 487-495.
56. Coutiño R, Hernández P, Giles H. Lectins in fruits having gastrointestinal activity: Their participation in the hemagglutinating property of *Escherichia coli* 0157:H7. Archives of Medical Research. 2001 (32): 251-257
57. Cristina J, Passarelli R, Nunes L, Di Stasi C, Fernandez A. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs use on *Staphylococcus aureus* diseases. 2006; 101 (4): 387-390.

58. Goncalves J, Lopes R, Oliveira D, Costa S, Miranda M, Romanos M, Santos N, Wigg M. In vitro anti-rotavirus activity of some medicinal plants used in Brazil against diarrhea. *J Ethnopharmacol.* 2005; 99: 403-407.
59. Ponce M, Navarro I, Martínez M, Álvarez R. Efecto anti-giardiasis in vitro de 14 extractos de plantas. *Rev Invest Clin.* 1994; 46 (5): 343-347.
60. Tona L, Kambu K, Ngimbi N, Cimanga K, Vlietinck A. Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 1998; 61: 57-65.
61. Temjenmongla T, Yadar A. Anticestodal efficacy of folklore medicinal plants of Naga tribes in North-East India. *Afr J Trad CAM.* 2005; 2 (2): 127-133.
62. Temjenmongla T, Yadar A. Anticestodal efficacy of *Psidium guajava* against experimental *Hymenolepis diminuta* infection in rats. *Indian J Pharmacol.* 2006; 38 (1): 29-32
63. Mathias E, Mc Corkle C. Traditional livestock healers. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 2004; 23 (1): 277-284.
64. Dold A, Cocks M. Traditional veterinary medicine in the Alice district of the Eastern Cape Province, South Africa. *South African Journal of Science* 2001; 97: 375-379.
65. Iqbal Z, Jabbar A, Akhtar M, Muhammad G, Lateef M. Possible role of ethnoveterinary medicine in poverty reduction in Pakistan: Use of botanical anthelmintics as an example. *Journal of Agriculture & Social Sciences.* 2005; 2: 187-195.
66. Bazalar H. Medicina etnoveterinaria. En: *I Curso de Herbolaria.* Lima, Perú. 1994.
67. Camiloaga S, Pineda C, Flores U. Plantas usadas en la medicina veterinaria folklórica de la provincia de Huánuco. En: *Memorias del XIX Congreso de Ciencias Veterinarias; Puno 24-26 de setiembre del 2008.* Puno: Altiplano EIRL, 2008. p. 94-96.

68. Lans C, Harper T, Georges K, Bridgewater E. Medicinal plants used for dogs in Trinidad and Tobago. *Preventive Veterinary Medicine*. 2000; 45: 201-220.
69. Lans C, Turner N, Brauer G, Lourenco G, Georges K. Ethnoveterinary medicines used for horses in Trinidad and in British Columbia, Canada. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 2006; 2: 31.
70. Vinent N, Ortiz R. Estudio sobre el efecto de la tintura de guayaba y manzanilla al 20% en diarreas porcinas. [sitio en internet]. Disponible en: www.veterinaria.org/revistas/redvet/n080803.html Consulta: Diciembre 2003.
71. Ryu S, Park C, Baek H, Baek S, Hwang S, Chung W. Anti-diarrheal and spasmolytic activities and acute toxicity study of Soonkijanjebo™, a herbal anti-diarrheal formula. *J Ethnopharmacol*. 2004; 91: 75-80.
72. Uddin S, Shilpi J, Alam S, Alamgir M, Rahman M, Sarker S. Antidiarrheal activity of the methanol extract of the barks of *Xylocarpus moluccensis* in castor oil-and magnesium sulphate-induced diarrhea models in mice. *J Ethnopharmacol*. 2005; 101: 139-143.
73. Zavala M, Pérez C, Vargas R, Pérez R. Antidiarrheal activity of *Walteria americana*, *Commelina coelestis* and *Alternanthera repens*. *J Ethnopharmacol*. 1998; 61: 41-47.
74. Pineda C, Camiloaga S, Zuñiga M. Actividad antimicrobiana del extracto de hojas de *Tagetes elliptica* L. (chincho) contra *Salmonella typhimurium* en cobayos (*Cavia porcellus*). *Investigación Valdizana*. 2007; 1 (1): 10-13.
75. Desjeaux J. Effects of sugar and aminoacids on sodium movement across small intestine. En: *Am J Dis Child*. 1997; 131: 331-340. Citado por: Riverón R. Fisiopatología de la diarrea aguda. En: *Rev Cubana Pediatr*. 1999; 71 (2): 86-115.

76. Riverón R. Avances recientes en la fisiopatología del agua y los electrolitos en el enterocito. En: Rev Cubana Pediatr. 1986; 58 (6): 773-792. Citado por: Riverón R. Fisiopatología de la diarrea aguda. En: Rev Cubana Pediatr. 1999; 71 (2): 86-115.
77. Field M, Rao M, Chang E. Intestinal electrolyte transport and diarrheal disease. En: N Engl J Med. 1989; 321: 800-806. Citado por: Riverón R. Fisiopatología de la diarrea aguda. En: Rev Cubana Pediatr. 1999; 71 (2): 86-115.
78. Tindall B, Grimont P, Garrity G, Euzéby J. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. International Journal of Systematic Microbiology. 2005; 55: 521-524.
79. Figueroa I, Verdugo A. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. Rev Latinoam Microbiol. 2005; 47 (1-2): 25-42.
80. Chauca L. Producción de cuyes (*Cavia porcellus*). Estudio FAO Producción y Sanidad Animal. Lima: FAO; 1997 (Serie de informes técnicos: 138).
81. Onyekaba C. Clinical salmonellosis in a guinea pig colony caused by a new *Salmonella* serotype, *Salmonella ochiogu*. Lab Anim. 1983; 17 (3): 213-216.
82. Gurel A, Ayyildiz G, Turan N, Pala T, Yilmaz H. Kobay Yetistirme unitesinde saptanan *Salmonella arizonae* infeksiyonu. Tr J of Veterinary and Animal Sciences. 1998; 22: 329-332
83. Iijima O, Saito M, Nakayama K, Kobayashi S, Matsumo K, Nakagawa M. Epizootiological studies of *Salmonella typhimurium* infection in guinea pig. Jikken Dobutsu. 1987; 36 (1): 34-39.
84. Okewole P, Uche E, Oyetunde I, Odeyemi P, Dawul P. Uterine involvement in guinea pig salmonellosis. Lab Anim. 1989; 23 (3): 275-277.
85. Albert M, Ansaruzzaman M, Faruque S, Haider K, Mayenue M, Kibriya A, Tzipori S. Outbreak of keratoconjunctivitis due to *Salmonella weltevreden* in a guinea pig colony. J Clin Microbiol. 1991; 29: 2002-2006.

86. Hanes M. Diseases of guinea pig. [sitio en internet]. Disponible en: www.afip.org/vetpath/POLA2005.pdf Consulta: Diciembre 2005.
87. Gupta R, Vernma P, Chaturvedi G. Experimental Salmonellosis in guinea pigs: Haematological and biochemical studies. *Veterinary Research Communications*. 1999; 23 (7): 415-424
88. Woodward D, Khakhria R, Johnson W. Human salmonellosis associated with exotic pets. *J Clin Microbiol*. 1997; 35: 2786-2790.
89. Smith K, Boxrud D, Leano F. Outbreak of multidrug-resistant *Salmonella typhimurium* associated with rodents purchased at retail pet stores-United States, December 2003-October 2004. *MMWR*. 2005; 54 (17): 429-433.
90. Instituto Nacional de Salud. Laboratorio de Enteropatógenos: Control de calidad y tipificación. Informe de resultados. Lima, 10 de junio del 2005.
91. Hernández N, Tereschuk M, Abdala L. Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafi del Valle (Tucuman, Argentina). En: *J Ethnopharmacol*. 2000; 73: 317-322. Citado por: Barbieri F, Pessini G, Sanches N, García D, Nakamura C, Dias B. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious disease. En: *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002; 97 (7): 1027-1031.
92. Djipa C, Delmee M, Quentin-Leclercq J. Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* L. (Myrtaceae). *J Ethnopharmacol*. 2000; 71 (1-2): 307-313
93. Alcaraz M, Ferrándiz M. Modification of arachidonic metabolism by flavonoids. *J Ethnopharmacol*. 1987; 21: 209-229.
94. Lutterodt G. Inhibition of gastrointestinal release of acetylcholine by quercetin as a possible mode of action of *Psidium guajava* leaf extracts in the treatment of acute diarrheal disease. *J Ethnopharmacol*. 1989; 25: 235-247.

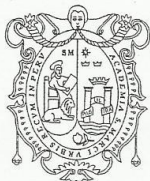
95. Lozoya X, Meckes M, Abou M, Tortoriello J, Nozzolello C, Arnason J. Quercetin glycosides in *Psidium guajava* L. leaves and determination of a spasmolytic principle. Archives of Medical Research. 1994; 25 (1): 11-15.
96. Morales M, Tortoriello J, Meckes M, Paz D, Lozoya X. Calcium-antagonist effect of quercetin and its relation with the spasmolytic properties of *Psidium guajava* L. Archives of Medical Research. 1994; 25 (1): 17-21.
97. Re L, Barocci S, Capitani C, Vivani C, Ricci M, Rinaldi L, Paoluci G, Scarpantonio A, Leon O, Morales M. Effects of some natural extracts on the acetylcholine release at the mouse neuromuscular junction. Pharmacological Research. 1999; 39 (3): 239-245.
98. Tsuchiya H, Sato M, Miyazaqui T, Fujiwara S, Tamigaki S, Ohyama M, Tanaka T, Iinuma M. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavonones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. En: J Ethnopharmacol. 1996; 50: 27-34. Citado por: Murphy M. Plants products as antimicrobial agents. En: Cli Microbiol Rev. 1999; 12: 564-582.
99. Arellano, P. El libro verde. Guía de recursos terapéuticos vegetales 1. Lima: INMETRA-MINSA; 1992
100. Cronquist A. The evolution and classification of flowering plants. 2 ed. New York Botanical Garden, Bronx; 1988.
101. Cáceres A, Fletes L, Aguilar L, Ramirez O, Figueroa L, Taracena A, Samayoa B. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 3. Confirmation of activity against enterobacteria of 16 plants. J Ethnopharmacol. 1993; 38: 31-38
102. Cáceres A, Cano O, Samayoa B, Aguilar L. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 1. Screening of 84 plants against enterobacteria. J Ethnopharmacol. 1990; 30: 55-73

103. Murphy M. Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev. 1999; 12 (4): 564-582.
104. Lock O. Análisis fitoquímico y el certificado de marcha fitoquímica. En: Instituto Nacional de Salud. Lima: INS; 1999 (Serie de documentos N° 9) p. 43-52.
105. Organization for Economic Co-operation and Development. Guideline for the testing of chemicals. Acute oral toxicity-Acute toxic class method. London: OECD; 1996. (Guideline 423).
106. Perez C, Pauli M, Bazevque P. An antibiotic assay by the agar well diffusion method. En: Acta Biol Med Exp. 1990; 15: 113-115. Citado por: Martínez M, Molina N, Boucourt E. Evaluación de la actividad antimicrobiana del *Psidium guajava* L. (guayaba). En: Rev Cubana Plant Med. 1997; 2 (1): 12-14.
107. Rojas J, Ochoa V, Ocampo S, Muñoz J. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. [sitio en internet]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1395329/pdf/1472-6882-6-2.pdf> Consulta: Octubre 2007.
108. Abdelrahim S, Almagboul A, Omer M, Elegami A. Antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. Fitoterapia. 2002; 73: 713-715.
109. Kuklinski C. Farmacognosia. Barcelona: Omega; 2003.
110. Chávez N, Escudero J, Gutiérrez C. Role ecological variables in the seasonal variation of flavonoid content of *Cistus ladanifer* exúdate. En: J Chem Ecol. 1997; 23: 2577. Citado por: Vargas D, Soto M, Gonzales V, Engleman E, Martínez A. Cinética de acumulación y distribución de flavonoides en guayaba (*Psidium guajava* L.). En: AGROCIENCIA. 2006; 40: 109-115.

111. Winkel B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. En: Plant Physiol. 2001; 126: 485-493. Citado por: Vargas D, Soto M, Gonzales V, Engleman E, Martínez A. Cinética de acumulación y distribución de flavonoides en guayaba (*Psidium guajava* L.). En: AGROCIENCIA. 2006; 40: 109-115.
112. Martinez M, Molina N, Boucourt E. Evaluación de la actividad antimicrobiana del *Psidium guajava* L. (guayaba). Rev Cubana Plant Med. 1997; 2 (1): 12-14.
113. Eloff J. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? J Ethnopharmacol. 1998; 60: 1-8.
114. Nascimento G, Locatelli J, Freitas P, Silva G. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. Braz J Microbiol. 2000; 31 (4): 247-256.
115. Chariandy C, Seaforth C, Phelps R, Pollard G, Khambay B. Screening of medicinal plants from Trinidad and Tobago for antimicrobial and insecticidal properties. J Ethnopharmacol. 1999; 64: 265-270.
116. Carvalho A, Smapaio M, Sampaio F, de Melo A, de Sena K, Chiapetta A, Higino J. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos hidroalcoólicos de *Psidium guajava* L. sobre bacterias Gram negativas. Acta Farm Bonaerense. 2002; 21 (4): 255-258.
117. Gnan S, Demello M. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by aqueous Goiaba extracts. J Ethnopharmacol. 1999; 68: 103-108.
118. Cos P, Vlietinck A, Berghe D, Maes L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. J Ethnopharmacol. 2006; 106: 290-302.
119. Domingo D, López-Brea M. Plantas con acción antimicrobiana. Rev Esp Quimioterap. 2003; 16 (4): 385-393.

120. Rabe T, van Staden J. Antibacterial activity of South African plants used for medicinal purposes. *J Ethnopharmacol.* 1997; 56: 81-87.
121. Sanches N, Garcia D, Schiavini M, Nakamura C, Dias B. An evaluation of antibacterial activities of *Psidium guajava* L. *Brazilian Archives of Biology and Technology.* 2005; 48 (3): 429-436.
122. Lutterodt G, Ismail A, Basheer R, Baharudin M. Antimicrobial effects of *Psidium guajava* extract as one mechanism of its antidiarrhoeal action. *Malaysian Journal of Medical Sciences.* 1999; 6 (2): 17-20
123. Holetz F, Pessini G, Sanches N, García D, Nakamura C, Dias B. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002; 97 (7): 1027-1031.
124. Morton J. Guava. En: Morton J. *Fruits of warm climates.* Miami, FL: Creative Resources System, INC; 1987. p. 356-363.
125. Ashaye O, Babalola S, Babalola A, Aina J, Fasoyiro S. Chemical and organoleptic characterization of pawpaw and guava leathers. *World Journal of Agricultural Sciences.* 2005; 1 (1): 50-51.

ANEXOS



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



CONSTANCIA N° 024-USM-2004

LA JEFA (e) DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (Tallo, hojas, flores) recibida del Sr. CARLOS ALBERTO PINEDA CASTILLO), ha sido estudiada y clasificada como: *Psidium guajava* L., y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB-CLASE : ROSIDAE

ORDEN: MYRTALES

FAMILIA: MYRTACEAE

GENERO: *Psidium*

ESPECIE: *Psidium guajava* L.

Nombre vulgar: "Guayabo"

Determinada por: Dra. Enma Cerrate.

Se extiende la presente constancia a solicitud del interesado, para los fines que estime conveniente.

Lima, 17 de Marzo de 2004.

Mg. Joaquina Alban Castillo

JEFA(e) DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

JAC/ddb



MINISTERIO DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
CENTRO NACIONAL DE SALUD PUBLICA
LABORATORIO DE ENTEROPATOGENOS

INFORME DE RESULTADOS

Establecimiento: DIREC.DE SALUD - HUANUCO

Referencia: Of.Nº2240-2005-Hco-Gr-Drs-Dg-RI

Dr.(a): WILLIAM ARELLANO SANTILLAN

DIREC.DE SALUD - HUANUCO

Jr.Damaso Beraún 1017 - HUANUCO

Fecha Toma Muestra : 06/01/2005

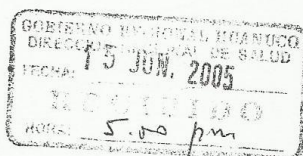
Fecha Recep. LAB : 11/05/2005

Fecha Recepción INS : 11/05/2005

CONTROL DE CALIDAD Y TIPIFICACION

Fecha de Emisión : 10/06/2005

Código Lab.Origen	Código INS	Código LANARE	Resultado Laboratorio de Origen	Resultado
01	05-24180-05	4.405-2005	Salmonella tiphymurium	Salmonella Kunduchi
02	05-24181-05	4.406-2005	Salmonella tiphymurium	Citrobacter freundii
03	05-24182-05	4.407-2005	Salmonella tiphymurium	Salmonella Typhimurium
04	05-24183-05	4.408-2005	Salmonella tiphymurium	Salmonella Typhimurium
05	05-24184-05	4.409-2005	Salmonella tiphymurium	Salmonella Kunduchi
05-B	05-24185-05	4.410-2005	Salmonella tiphymurium	Salmonella Kunduchi
06	05-24186-05	4.411-2005	Salmonella tiphymurium	Salmonella Typhimurium
07	05-24187-05	4.412-2005	Salmonella tiphymurium	Salmonella Typhimurium
08	05-24188-05	4.413-2005	Salmonella tiphymurium	Salmonella Typhimurium



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
[Signature]
Bga. MAGNA AURORA SUAREZ JARA
Directora Ejecutiva de Epidemiología y Transmisibles
CENTRO NACIONAL DE SALUD PUBLICA

CAPAC YUPANQUI Nº1400 Lima 14-Apartado nº 451 Telef.(511)471-9920-Anexo 115 y 144-Telefax (511)471-2529

Salpu@ins.sld.pe Lima - Peru